

Aus dem Lehrstuhl
für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. Dr. André Gessner
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Untersuchungen zum *Cross Priming* Potential der HIV Vakzinekandidaten
EHV-C/B und NYVAC-C/B auf über Monozyten generierten dendritischen
Zellen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Matthias Vogel

2013

Aus dem Lehrstuhl
für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. Dr. André Gessner
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Untersuchungen zum *Cross Priming* Potential der HIV Vakzineandidaten
EHV-C/B und NYVAC-C/B auf über Monozyten generierten dendritischen
Zellen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Matthias Vogel

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2013

Die Wissenschaft, richtig verstanden, heilt den Menschen von seinem Stolz,
denn sie zeigt ihm seine Grenzen.

Albert Schweitzer (1875-1965)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Bedeutung von Impfstoffen und Impfstoffentwicklung.....	1
1.2	HIV-Impfstoffentwicklung – grundsätzliche Schwierigkeiten und Herausforderungen.....	2
1.3	Impfstoffe und verschiedene Vakzinierungsstrategien.....	2
1.4	Immunologische Aspekte zur Entwicklung eines HIV-Impfstoffs.....	4
1.4.1	T-Zellen.....	4
1.4.2	Dendritische Zellen.....	5
1.4.3	Antigenpräsentation.....	6
1.4.4	<i>Cross Priming</i>	7
1.5	Zielsetzung.....	9
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Vakzinekandidaten.....	10
2.1.1	Equines Herpesvirus – EHV-C/EHV-B.....	10
2.1.2	New York Vakzinia Virus – HIV-C/HIV-B.....	10
2.2	Zellkulturtechniken.....	11
2.2.1	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	11
2.2.2	Kultivierung von MRC-5 Zellen.....	11
2.2.3	Fibrozytengenerierung aus CD14 ⁺ Zellen.....	11
2.2.4	Einfrieren von PBMCs.....	12
2.2.5	Auftauen von PBMCs.....	12
2.3	Isolierung und Aufreinigung von Primärzellen.....	12
2.3.1	Isolierung von PBMCs aus Buffy Coat oder Vollblut.....	12
2.3.2	Generierung von MDDCs (monocyte derived dendritic cells) aus Monozyten (CD14 ⁺ Zellen).....	13
2.4	Versuche zur Bestimmung des <i>Cross Priming</i> Potentials von MDDCs.....	14
2.4.1	Infektion der verschiedenen Zellen.....	15
2.4.2	Stimulation von MDDCs mit dem Überstand aus virusinfizierten Zellen.....	17
2.4.3	Stimulation von MDDCs mittels virusinfizierter Zellen durch Co-Kultur in Transwells.....	18

2.4.4	<i>Cross Priming</i> von T-Zellen durch MDDCs, die vorher durch den Überstand virusinfizierter autologer Fibrozyten stimuliert wurden.....	18
2.4.5	Direkte Stimulation der MDDCs mit EHV-B/C oder NYVAC-B/C.....	19
2.5	FACS-Analysen.....	19
2.5.1	FACS-Färbung verschiedener Oberflächenmarker von MDDCs.....	20
2.5.2	Intrazellulärer GagPolNef Nachweis mittels p24-FACS-Analyse.....	20
2.5.3	Charakterisierung von Fibrozyten mittels indirekter anti-Collagen I FACS-Analyse.....	21
2.6	Zytokin-ELISA.....	22
2.7	Interferon- γ -Elispot.....	23
3	Ergebnisse.....	25
3.1	FACS-Analyse der Oberflächenmarkerexpression von MDDCs, die vorher durch virusinfizierte MRC-5 Zellen stimuliert wurden.....	25
3.1.1	Stimulation der MDDCs durch den Überstand virusinfizierter MRC-5-Zellen.....	25
3.1.2	Vergleich zwischen der Verwendung von Fetalem Kälberserum (FKS) und humanem AB-Serum (ABS) im Medium der MRC-5-Zellen in Bezug auf die Oberflächenmarkerexpression von MDDCs.....	27
3.1.3	Vergleich der CD80-Oberflächenmarkerexpression von MDDCs durch Stimulation mit reinem Medium und Medium, das vorher in Kontakt mit MRC-5-Zellen war.....	30
3.2	Analyse der Oberflächenmarkerexpression von MDDCs, die vorher durch den Überstand virusinfizierter autologer PBMCs oder CD14 ⁺ stimuliert wurden.....	31
3.3	Vergleich der beiden <i>in vitro</i> Modelle zur Bestimmung des <i>Cross Priming</i> Potentials: Inkubation in Transwells oder Verwendung des Überstands virusinfizierter Zellen.....	34
3.4	Intrazellulärer GagPolNef Nachweis mittels p24-FACS-Analyse von EHV-C und NYVAC-C infizierten PBMCs.....	36
3.5	Generierung von Fibrozyten aus PBMC oder CD14 ⁺	37
3.5.1	Generierung von Fibrozyten mit verschiedenen Medien (UltraCulture, DMEM + 20% FKS) und vergleich zwischen normalen Kulturflaschen und Fibronectin gecoateten Kulturflaschen.....	37

3.5.2	Vergleich der Fibrozytengenerierung aus PBMCs und aus CD14 ⁺ Zellen durch den Einsatz jeweils unterschiedlicher Anzahl pro cm ²	38
3.5.3	Indirekte Collagen-I-Färbung und FACS-Analyse gewonnener Fibrozyten.....	40
3.6	FACS-Analyse der Oberflächenmarkerexpression von MDDCs, die vorher durch den Überstand virusinfizierter autologer Fibrozyten stimuliert wurden.....	40
3.7	Zytokingehalt nach Stimulation der MDDCs mit Überstand virusinfizierter Zellen oder mittels Co-Kultur mit virusinfizierten Zellen im Transwell.....	43
3.8	<i>Cross Priming</i> von T-Zellen durch MDDCs, die vorher mittels autologer infizierter Fibrozyten stimuliert wurden.....	44
3.8.1	FACS-Analyse der Oberflächenmarkerexpression der MDDCs.....	45
3.8.1.1	FACS-Analyse der MDDC Oberflächenmarkerexpression nach Infektion mit NYVAC-C/EHV-C in verschiedenen MOIs.....	45
3.8.1.2	FACS-Analyse der MDDC Oberflächenmarkerexpression nach Stimulation durch infizierte autologe Fibrozyten.....	48
3.8.2	Interferon- γ Sekretion von T-Zellen nach <i>Cross Priming</i> mit EHV-B und NYVAC-B durch verschiedenartig stimulierte MDDCs.....	51
4	Diskussion.....	53
4.1	MRC-5 Zellen stimulieren die Oberflächenmarkerexpression von MDDCs.....	53
4.2	Autologes <i>in vitro</i> Modell zur Untersuchung des <i>Cross Priming</i> Potentials von EHV-C und NYVAC-C.....	54
4.3	Zwei unterschiedliche <i>in vitro</i> Modelle zur Untersuchung des <i>Cross Priming</i> Potentials von MDDCs liefern vergleichbare Ergebnisse: „Transwellversuch“ vs. „Stimulation mit Überstand infizierter Zellen“.....	55
4.4	EHV-infizierte autologe PBMCs bewirken in MDDCs höhere intrazelluläre p24 Expression als NYVAC-infizierte autologe PBMCs.....	56
4.5	Aus PBMCs oder CD14 ⁺ Zellen lassen sich Fibrozyten generieren.....	57
4.6	Überstand EHV-infizierter autologer Fibrozyten stimuliert die Oberflächenmarkerexpression von MDDCs mehr als der Überstand NYVAC-infizierter autologer Fibrozyten.....	57
4.7	Erhöhte Produktion von den Zytokinen IL-6, IL-10, IL-12 und TNF-alpha nach Stimulation der MDDCs mit dem Überstand EHV-infizierter PBMCs.....	60

4.8	Infizierte Fibrozyten ohne Auftrennung in Überstand und Pellet bewirken bei MDDCs eine höhere Oberflächenmarkerexpression.....	61
4.9	Inaktivierung des Virus mit UV-Strahlung ($6 \times 0,12 \text{ J/cm}^2$) ist unzureichend.....	62
4.10	<i>Cross Priming</i> Potential von MDDCs auf T-Zellen mittels EHV und NYVAC.....	62
5	Zusammenfassung.....	64
6	Ausblick.....	66
7	Anhang.....	67
8	Abkürzungsverzeichnis.....	72
9	Literaturverzeichnis.....	75
10	Danksagung.....	79
11	Eidesstattliche Erklärung.....	80

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Impfstoffen und Impfstoffentwicklung

Der Einfluss des Impfens auf die Gesundheit der Weltbevölkerung stellt einen beispiellosen Meilenstein der menschlichen Evolution und der medizinischen Forschung dar. Nahezu keine andere medizinische Maßnahme hat in den letzten 200 Jahren die Sterblichkeitsrate so wirkungsvoll gesenkt beziehungsweise die Populationsrate gesteigert.

Schon die Chinesen und andere asiatische Völker stützten sich in den ersten Jahrhunderten nach Christus auf die Beobachtung, dass Pockenranke, die die Infektion überlebten, seltener an Pocken erkrankten. Sie lösten die Krankheit bei Gesunden durch Inokulation von Pockenmaterial absichtlich aus und wandten so das immunologische Prinzip der Impfung an. Trotzdem beginnt die Geschichte der Impfstoffforschung und Impfstoffentwicklung erst im Jahre 1796 mit Edward Jenner, der den wissenschaftlichen Versuch dazu wagte. Er demonstrierte erstmals, dass ein Mensch, dem er zuvor Kuhpocken inokulierte, später nicht an Pocken erkrankte. Fast ein Jahrhundert später gelang Louis Pasteur der nächste entscheidende Schritt in der Impfstoffentwicklung. Dank Robert Koch konnte er Hühner-Cholera-Bakterien in reine Kultur bringen. Als er eine derartige Kultur aus Versehen für ein paar Wochen der Luft aussetzte, stellte er fest, dass sie bei Hühnern keine Krankheit auslöste und diese auch weiterhin vor Krankheit geschützt waren, wenn sie mit dem virulenten Erreger der Cholera infiziert wurden. Der bald darauf entwickelte Impfstoff gegen Tollwut basierte auf dieser Vorgehensweise der Attenuierung. Weitere Innovationen um die Jahrhundertwende brachten durch Inaktivierung von mikrobiologischen Organismen die Totimpfstoffe gegen Typhus, Cholera und Pest hervor.¹⁻³

Insgesamt führten die Erkenntnisse der Impfstoffforschung und der Immunologie dazu, dass die WHO die Pockeneradikation 1980 offiziell deklarieren konnte, 3 Jahre nach dem letzten Pockenfall in Somalia.⁴ Inzwischen steht Poliomyelitis kurz davor, durch konsequente Impfung besiegt zu werden. 2010 tritt das Poliovirus nur noch in den 4 Ländern Afghanistan, Indien, Nigeria und Pakistan endemisch auf.⁵

Die Errungenschaften der Immunisierung stellen auch heute noch die Grundprinzipien der modernen Impfstoffforschung dar und konnten Millionen Menschen das Leiden und Sterben an gefährlichen Infektionskrankheiten ersparen. Die Entwicklung von Immunisierungsstrategien gegen Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen spielt immer noch eine der wichtigsten Rollen in der modernen Medizin. Gerade die Infektionskrankheiten machen den größten Anteil an der krankheitsbezogenen weltweiten Mortalität und Morbidität

aus und können durch einen geeigneten Impfstoff oder durch nachhaltige Impfprogramme bekämpft werden. Darüber hinaus zählen Schutzimpfungen zu den ökonomischsten Präventivmaßnahmen in der Medizin. Die Herstellung guter Impfstoffe und eine intensive Impfstoffforschung sind also gerechtfertigt, weil sie effektiv Krankheiten vorbeugen und effizient sind.

1.2 HIV-Impfstoffentwicklung – grundsätzliche Schwierigkeiten und Herausforderungen

Trotz der gewaltigen wissenschaftlichen Anstrengung der letzten Jahrzehnte die Krankheit AIDS zu behandeln beziehungsweise eine Infektion mit dem HI-Virus zu verhindern, bleibt die Entwicklung einer adäquaten Therapie und die Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes gegen HIV auch eine Herausforderung im 21. Jahrhundert.

Diese Schwierigkeiten zeigen sich in vielerlei Hinsicht vor allem im Aufbau und der Pathogenese des Virus' selbst und im unzureichenden Verständnis der Immunologie des Menschen. Zu beachten sind bei der Entwicklung eines HIV-Impfstoffs verschiedene Punkte: Die hohe Fehlerrate bei der reversen Transkriptase ließ eine hohe Variabilität des HI-Virus entstehen. Das führte zu vielen unterschiedlichen Klassen, die sich wiederum in Subtypen und Varianten unterteilen. Zudem infiziert das Virus hauptsächlich Zellen der Immunabwehr, darunter Monozyten, Makrophagen und CD4⁺-T-Zellen. Gerade diese T-Helfer-Zellen sind für eine adäquate zelluläre Immunantwort von großer Bedeutung, indem sie zytotoxische T-Zellen (CTL) aktivieren. Zusätzlich persistiert der Erreger extrem lange in lymphatischen Organen und im Gehirn, welche für das Virus einen Schutz vor dem Immunsystem und Therapien bietet. Die genauen Mechanismen der Virusübertragung, insbesondere die Rolle der mukosalen Immunabwehr, sind bis dato unzureichend verstanden. Schwierig gestaltet sich bisher auch die Testung einer ausreichenden Immunantwort von HIV-Vakzinekandidaten in geeigneten Tiermodellen und *in vitro*. Oft sind die Verfahren nur schlecht auf die immunologischen Vorgänge im Menschen übertragbar.⁶

1.3 Impfstoffe und verschiedene Vakzinierungsstrategien

Essentiell für eine ausreichende Immunität gegen HIV sind eine gute mukosale Abwehrfunktion und die Kombination von neutralisierenden Antikörpern mit der Induktion einer zellulären Immunität. Gerade eine spezifische T-Zell-Antwort auf das HI-Virus kann die

Infektion zu Beginn und auch im weiteren Verlauf kontrollieren. Deshalb zielt die Entwicklung eines Impfstoffes inzwischen aufgrund der anhaltenden Schwierigkeiten weniger darauf ab, eine Infektion mit HIV definitiv zu verhindern. Vielmehr rückt die Kontrolle der Infektion in den Vordergrund. So scheinen T-Lymphozyten maßgeblich daran beteiligt zu sein, eine exzessive Virämie zu vermeiden. Durch Untersuchungen an Affen ließ sich eindrucksvoll die Notwendigkeit von zytotoxischen T-Zellen (CTL) für die Kontrolle der Virusinfektion zeigen. Affen, bei denen die CD8⁺ T-Zellen durch einen monoklonalen CD8-Antikörper eliminiert wurden, konnten die Virusreplikation nicht kontrollieren und hatten einen schnelleren und stärkeren Krankheitsverlauf als Affen mit ausreichender CD8⁺ T-Zellzahl.⁷ Durch eine Vakzine mit guter zellulärer Immuninduktion könnte eine Erkrankung an AIDS verhindert werden. In der Folge würde auch die Ansteckung mit HIV durch Personen mit geringer Viruslast reduziert.⁸⁻¹¹

Zahlreiche Impfstoffarten wurden bisher entwickelt. Diese werden in unterschiedlichen Impfprotokollen zu einer prime-boost Vakzinierungsstrategie kombiniert. Vier Vakzinekandidaten und Strategien wurden bisher in Phase III und IIb auf ihre Effektivität an menschlichen Freiwilligen untersucht (vgl. Tabelle 1).¹⁰

Tabelle 1

Vakzine	Code und Versuchsort	Ergebnis
Gp120 (B/B'od. B/E) + alum	VAX003 (America) VAX004 (Thailand)	Keine Effektivität
Ad5-HIV-1 trivalente Vakzine (Gag, Pol, Nef)	Step America + Australia Phambili (Südafrika)	Keine Effektivität Erhöhte Infektionsrate bei Ad5-seropositiven nicht beschnittenen Männern
Canarypox (ALVAC)-Gag Pol Env E + gp120 B/E + alum	RV144 (Thailand)	31% protektive Effektivität gegenüber HIV-1
DNA-Gag, Pol, Env priming + Ad5-GagPolNev (A,B,C) boost	HVTN505 (America)	Laufende Phase IIb

Girard et al., Vaccine 2011¹⁰

Tabelle 2 gibt einen Überblick über verschiedene Impfstofftypen, die in fünf Hauptgruppen unterteilt sind: (i) attenuierte Lebendimpfstoffe, (ii) inaktivierte Totimpfstoffe und virus-like particles (VLPs), (iii) Subunit Vakzine, (iv) DNA-Vakzine, (v) rekombinante Lebendimpfstoffe.^{6, 10} In der vorliegenden Arbeit werden als potentielle Vakzinekandidaten EHV und NYVAC miteinander verglichen. Beide Impfstoffe gehören zu den rekombinanten Lebendimpfstoffen. Dabei fungiert das Virus als Vektor, um Gene, die für gewünschte HIV-Antigene wie Gag, Pol, Nef oder Env kodieren, in die Wirtszelle zu befördern. Nach der Infektion werden diese Antigene von der Wirtszelle produziert und im Proteasom bearbeitet. Über MHC-I Moleküle werden sie schließlich als Fremdproteine den CD8⁺ T-Zellen präsentiert und bilden so eine zelluläre Immunantwort aus. Alternativ könnten die mit dem

Vektor infizierten Zellen von antigenpräsentierenden Zellen wie dendritische Zellen phagozytiert und mittels Cross Presentation den zytotoxischen T-Zellen (CTL) präsentiert werden (Vgl. *Cross Priming*).¹⁰

Tabelle 2

Vakzine	Beispiel	Eigenschaften
Attenuierte Lebendimpfstoffe	SIV Δnef	Persistierende Virusinfektion mit unbekannten Langzeitfolgen
Inaktivierte Totimpfstoffe und VLPs	Aldithriol inaktiviertes SIV	Niedrige Immunogenität, begrenzte NAb-Antwort keine Protektion im Makaken/SIV-Modell
Subunit-Vakzine	ΔV2 gp140 ⁺ MF59	Verbesserte, aber begrenzte NAb-Antwort
DNA-Vakzine		v.a. CD4 ⁺ T-Zell-Antwort prime-boost Strategie (prime: DNA-Vakzine; boost: rekombinanter Lebendimpfstoff)
Rekombinante Lebendimpfstoffe	Ad5 Rekombinante MVA EHV NYVAC	CD8 ⁺ >CD4 ⁺ T-Zell-Antwort Begrenzte Immunogenität bei Personen, die prä-immun gegenüber dem Vektor sind Begrenzter Einfluß wiederholter Immunisierungen mit dem gleichen Vektor Kombination mit DNA priming Kombination mit Subunit-Vakzine

Girard et al., Vaccine 2011¹⁰

1.4 Immunologische Aspekte zur Entwicklung eines HIV-Impfstoffs

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen HIV setzt die Kenntnis des menschlichen Immunsystems insbesondere im Zusammenspiel mit einer HIV-Infektion voraus. Leider sind diese Vorgänge bis heute immer noch unzureichend verstanden. Die Notwendigkeit neutralisierender Antikörper einerseits und einer zellulären T-Zell vermittelten Immunität andererseits scheint trotzdem ausschlaggebend für die Beherrschung einer HIV-Infektion und AIDS-Erkrankung zu sein. Dabei spielt nicht nur die Anzahl der Antigen-spezifischen T-Zellen, sondern auch die Qualität einer spezifischen T-Zell-Antwort im Sinne einer differenzierten Zytokinproduktion eine Rolle. Wie jedoch durch eine Vakzine neutralisierende Antikörper und eine adäquate T-Zell-Antwort generiert werden können bleibt nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung.¹²

1.4.1 T-Zellen

T-Zellen gehören neben den B-Zellen und Natural Killer Zellen zu den Lymphozyten und bilden eine tragende Säule der zellvermittelten Immunantwort des erworbenen Immunsystems. Sie haben die Aufgabe intrazelluläre Erreger wie Viren oder auch Bakterien zu erkennen und zu zerstören. Dagegen übernehmen von B-Zellen gebildete Antikörper die Pathogenabwehr im Blut und Extrazellularraum.

T-Zellen werden unterschieden in regulative T-Zellen, NK-T-Zellen (Natural Killer T-Zellen), $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen. Letzteren beiden T-Zellpopulationen werden intrazelluläre Erreger in Fragmenten über spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche der infizierten Zelle präsentiert. $CD4^+$ T-Helferzellen erkennen Peptide nur über MHC-II-Moleküle, $CD8^+$ T-Zellen nur über MHC-I-Moleküle. Ihren Ausgang nehmen die Peptide, die über MHC-Moleküle präsentiert werden, aus unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. Über das MHC-I-Molekül präsentiert entstammen die Peptide von Proteinen, die in der Zelle synthetisiert wurden. MHC-II-Moleküle zeigen Peptide, die nach Phagozytose durch Makrophagen oder antigenpräsentierende Zellen in das Zytosol gelangt sind. Die Interaktion mit der infizierten Zelle übernimmt die T-Zelle mit dem T-Zellrezeptor (TCR), wobei für die T-Zellaktivierung die Verstärkung der MHC-TCR-Bindung durch costimulatorische Oberflächenmoleküle notwendig ist. Durch Zytokinproduktion oder auch direkten Zellkontakt aktivieren schließlich die $CD4^+$ T-Helferzellen Makrophagen, B-Zellen oder auch $CD8^+$ T-Zellen und nehmen damit eine wichtige regulatorische Funktion ein. Eine weitere Differenzierung der $CD4^+$ T-Helferzellen in TH1- oder TH2-Zellen bestimmt eine dominierende humorale oder zelluläre Immunantwort. $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen haben die Fähigkeit die infizierte Zielzelle durch Lyse zu zerstören.^{13, 14}

1.4.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen gehören neben B-Zellen und Makrophagen zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC). Sie haben die Aufgabe, über naive T-Zellen entweder eine Immuntoleranz auszuüben oder andererseits eine Immunantwort auf ein bestimmtes Antigen zu geben. In dieser Funktion nehmen sie eine Schlüsselrolle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem wahr. Für die Aktivierung der T-Zelle sind neben der Antigenpräsentation auch costimulatorische Signale über spezifische Oberflächenmoleküle wie CD80 und CD86 der dendritischen Zelle notwendig. Diese Moleküle und auch eine zusätzliche Zytokinproduktion werden oft über eine Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) hochreguliert.¹⁵

Erstmals wurden dendritische Zellen 1868 als Langerhans-Zellen in der Haut entdeckt. Doch erst in den letzten drei Jahrzehnten wurde ihre herausragende Stellung innerhalb des Immunsystems zunehmend deutlich.¹⁶

Beim Menschen existieren die lymphoide oder auch plasmazytoide und die myeloische Zelllinien dendritischer Zellen. Sie entspringen aus einer Progenitorzelle im Knochenmark

und werden über das Reaktionsprofil mit anti-CD11c und anti-CD123 Antikörpern definiert. Auf der Basis eines differenzierten Zytokinmilieus, dem hauptsächlich der granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) zugrunde liegt, entstehen über Zwischenstufen aus einer lymphoiden oder plasmazytoiden Vorläuferzelle immature dendritische Zellen. Allerdings unterscheiden sich lymphoide und plasmazytoide dendritische Zellen hinsichtlich ihrer Verteilung im Gewebe und ihrer unterschiedlichen Zytokinproduktion, die wiederum eine eher humorale oder zelluläre Immunantwort verursacht.^{17, 18}

Immature dendritische Zellen befinden sich in sehr unterschiedlichen Gewebearten und besitzen eine hohe Phagozytosefähigkeit. Nach Aktivierung durch einen Pathogenkontakt maturieren immature dendritische Zellen, indem sie zur T-Zell Antigenpräsentation in lymphatische Gewebe auswandern. Zusätzlich verlieren sie ihre Phagozytosefähigkeit und regulieren für eine T-Zellaktivierung costimulatorische Oberflächenmoleküle wie vor allem CD80, CD83, CD86, CD40 und CCR7 hoch.^{16, 18, 19} Diese Moleküle wurden auch in dieser Arbeit mittels FACS-Analyse bei maturen monocyte derived dendritic cells (MDDCs) bestimmt.

Da dendritische Zellen aus dem menschlichen Blut schwer zu gewinnen sind, werden sie oft aus peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMCs), die einfacher aus dem menschlichen Blut zu isolieren sind, *in vitro* zu monocyte derived dendritic cells (MDDCs) generiert. Auch in dieser Arbeit wurden MDDCs verwendet, um die Versuche mit dendritischen Zellen durchzuführen.

1.4.3 Antigenpräsentation

Für die Ausbildung einer zellulären Immunität sind einerseits die antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen) und die T-Zellen notwendig. Die dendritische Zelle präsentiert der T-Zelle eine antigene Struktur über MHC-I oder MHC-II-Moleküle. Klassischerweise werden den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen über MHC-I-Moleküle intrazellulär synthetisierte Peptide präsentiert, also auch Virus- oder Tumorzellbestandteile. Das führt letztlich zu einer Lyse der infizierten beziehungsweise „erkrankten“ Zelle. MHC-I-Moleküle kommen auf allen kernhaltigen Körperzellen vor, jedoch hauptsächlich auf hämatopoetischen Zellen. Dagegen werden über MHC-II-Moleküle antigene Strukturen präsentiert, die extrazellulär über Phagozytose aufgenommen wurden, den CD4⁺ T-Helferzellen. MHC-II-Moleküle sind vor allem auf antigenpräsentierenden Zellen verbreitet. CD4⁺ T-Helferzellen ihrerseits aktivieren

andere Effektorzellen wie B-Zellen, Makrophagen oder zytotoxische T-Zellen und regen diese zur Antikörperproduktion (B-Zellen), zur Pathogenzerstörung in ihren Phagozytosevesikeln (Makrophagen) oder zur direkten Lyse (CTL) an.²⁰

Im Wesentlichen erhält die naive T-Zelle drei Signale von der dendritischen Zelle. Dabei sind für die klonale Expansion einer naiven T-Zelle der spezifische Antigenkontakt und costimulatorische Signale derselben dendritischen Zelle unabdingbar: (i) die Peptiderkennung des T-Zellrezeptors über das MHC-Molekül; (ii) die Ausbildung costimulatorischer Oberflächenmoleküle; (iii) die Schaffung eines entsprechenden Zytokinmilieus durch die dendritische Zelle oder auch andere Immunzellen. Daraus entstehen für die T-Zelle folgende Effekte: (i) spezifische Antigenerkennung und klonale Expansion mit Aktivierung anderer Immunzellen oder Lyse erkrankter Zellen je nach involvierter T-Zelle; (ii) T-Zell-Targeting (Toleranz versus Immunität); (iii) T-Zell-Polarisierung (Th1-Antwort oder Th2-Antwort). Eine aktivierte T-Zelle braucht schließlich als Effektorzelle keine costimulatorischen Signale von der Zielzelle. Alleine der Antigenkontakt reicht aus, um ihre Effektorfunktion auszuüben.^{21, 22}

1.4.4 Cross Priming

Der Begriff „*Cross Priming*“ wird in der Literatur oft eingesetzt, doch nicht selten fehlt eine ausreichende Definition. Zusätzlich erschwert die Verwendung des Terminus „*Cross Presentation*“ im Zusammenhang mit der Rede vom „*Cross Priming*“ das Verständnis. Deshalb werden im Folgenden zunächst die Begriffe „*Cross Priming*“ und „*Cross Presentation*“ nach Auffassung des Autors definiert. Dies ohne Anspruch auf allgemeine Gültigkeit und mit dem Wissen, dass die Begrifflichkeiten auch anders definiert werden oder sogar synonym verwendet werden. Anschließend wird das Funktionsprinzip erklärt.

Cross Priming bezeichnet den Vorgang, bei dem eine Zelle eine extrazelluläre antigene Struktur internalisiert und in der Folge eine naive CD8⁺ zytotoxische T-Zelle auf diese spezifische antigene Struktur aktiviert wird. Zielpunkt ist bei *Cross Priming* die aktivierte CD8⁺ zytotoxische T-Zelle. Ein Mechanismus, durch den der Vorgang *Cross Priming* ermöglicht wird, ist *Cross Presentation*. Dabei werden von einer dendritischen Zelle extrazelluläre antigene Strukturen wie Viruspartikel oder infizierte nekrotische oder apoptotische Zellfragmente endozytiert. Entgegen des klassischen Wegs werden diese Peptide nicht über MHC-II-Moleküle den CD4⁺-T-Helferzellen präsentiert, sondern über MHC-I-Moleküle den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. Zielpunkt ist bei *Cross Presentation* die

besondere antigenpräsentierende Fähigkeit der dendritischen Zelle. Denkbar wäre natürlich auch, dass *Cross Priming* zusätzlich über andere Mechanismen, die bis jetzt noch völlig unbekannt sind, verwirklicht wird.^{23, 24}

Das Verständnis der Vorgänge des *Cross Presentation* setzt die Kenntnis der intrazellulären Prozessierung endogener und exogener Antigene voraus. Exogene Antigene werden durch Endozytose von phagozytosefähigen Zellen in das vesikuläre Kompartiment der Zelle aufgenommen. In diesen Vesikeln zerlegen Proteasen die Pathogene bei niedrigem pH in Peptid. Diese werden auf MHC-II-Moleküle geladen, die mit zunächst geblockter Bindungsstelle vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu den Endosomen gelenkt werden. Endogene Antigene befinden sich im zytosolischen Kompartiment. Dort werden sie wie alle synthetisierten Proteine der Zelle im Proteasom zerlegt und mittels eines speziellen Transporters (TAP, transporters associated with antigen processing) zum Endoplasmatischen Retikulum gebracht. Hier werden sie auf MHC-I-Moleküle geladen und zur Zelloberfläche transportiert.²⁵

Die genauen intrazellulären Mechanismen für *Cross Presentation* bleiben bis heute unklar. Dennoch lassen sich verschiedene Hypothesen teilweise bestätigen, bei denen exogene Antigene aus dem vesikulären Prozessierungsweg mit den MHC-I-Molekülen aus dem zytosolischen Prozessierungsweg verbunden werden. Hauptsächlich zwei Wege bilden die Grundlage der Hypothesen: (i) Die ER-Membran mit den MHC-I-Molekülen fusioniert mit Phagosomen, die exogene Antigene enthalten; (ii) exogene Antigene werden in das Zytosol exportiert und gelangen so wie endogene Proteine über das Proteasom zum ER. So konnte bereits eindrucksvoll biochemisch, morphologisch und funktional gezeigt werden, dass sich die ER-Membran mit der Phagosomenmembran verbindet.^{23, 26-28} Möglich ist, dass dabei neue Zellorganellen entstehen, die die gesamte MHC-I-Maschinerie enthalten. Phagozytierte Antigene werden ins Zyotosol exportiert und nach Zerlegung im Proteasom über den TAP-Komplex wiederum in das Phagosom gebracht, um mit MHC-I-Molekülen verbunden zu werden.²⁹

Die Antigenquelle für dendritische Zellen zum *Cross Presentation* ist nicht nur das Virus selbst, sondern auch die Aufnahme von antigenen Strukturen über apoptotische oder nekrotische virusinfizierte Zellen. Durch das *Cross Priming* kann so eine zelluläre Immunität auch gegen Viren, die die konventionelle MHC-I-Antigen-Prozessierung spezifisch inhibieren, gewährleistet werden. Außerdem müssen dendritische Zellen nicht selbst infiziert werden, um eine zelluläre Immunantwort zu initiieren.³⁰

1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte das *Cross Priming* Potential der potentiellen Vakzinekandidaten EHV-C und NYVAC-C untersucht werden. In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass EHV-C im Gegensatz zu NYVAC-C dendritische Zellen durch direkte Infektion maturieren kann. Da jedoch auch NYVAC-C *in vivo* als DNA prime/NYVAC boost Vakzinierungsstrategie eine CTL-Antwort auslösen kann, stellt sich die Frage ob die direkte Infektion von dendritischen Zellen für eine adäquate CTL-Antwort ausschlaggebend ist. Auch für den viralen Vektor EHV-C ist zu postulieren, dass sich die Maturation von dendritischen Zellen und die zelluläre Immunantwort durch *Cross Priming* verbessert. Da der Impfstoff *in vivo* nicht direkt auf dendritische Zellen verabreicht wird, ist es *in vitro* von besonderem Interesse zu untersuchen, zunächst andere Zellen direkt zu infizieren, die dann wiederum dendritische Zellen stimulieren. Dabei sollte gezeigt werden, dass dendritische Zellen auch indirekt durch EHV-C und NYVAC-C maturiert werden können und ihrerseits in der Lage sind zytotoxische T-Zellen zu aktivieren. Für diese Untersuchungen des *Cross Priming* musste zunächst ein geeignetes Zellkultursystem entworfen werden.

Als primär zu infizierende Zellen sollten MRC-5 Zellen verwendet werden. Gegebenenfalls sollte ein autologes Zellkultursystem entworfen werden, um den Vorgang des *Cross Priming in vitro* zu simulieren. Danach sollten die Überstände der infizierten Zellen MDDCs stimulieren und die Oberflächenmarker nach Maturation der MDDCs mittels FACS-Analyse gemessen werden. Alternativ sollten die MDDCs mit MRC-5 Zellen in Transwells in Co-Kultur stimuliert werden. Um das *in vitro Cross Priming* System abzuschließen, sollten zytotoxische T-Zellen durch maturierte MDDCs aktiviert werden. Die aus der Aktivierung resultierende Interferon- γ Produktion der zytotoxischen T-Zellen sollte mittels Interferon- γ Elispot gemessen werden.

Die Hypothese war, dass die Vakzinekandidaten EHV-C und NYVAC-C über MDDCs ein *Cross Priming* Potential haben und dass MDDCs dadurch besser maturiert und stimuliert werden als durch direkte Infektion mit EHV-C und NYVAC-C alleine.

2 Material und Methoden

2.1 Vakzinekandidaten

2.1.1 Equines Herpesvirus – EHV-C/EHV-B

Als potentielle Vakzine wurde der virale Vektor EHV-C verwendet, der von Hofmann-Sieber et. al entwickelt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde. Mit Hilfe der BAC-Technologie wurde in das virale Genom von EHV-1 das mini F-Plasmid (prokaryontisches Fertilitätsplasmid) eingebracht, um die Vermehrung, Selektion und Rekombination der DNA im prokaryontischen System zu ermöglichen. In einem nächsten Schritt folgte die Herstellung der rekombinanten EHV in einem zweistufigen RED-vermittelten, homologen Rekombinationsprozess. Dabei wurde in das mini F-Plasmid des EHV-Bacmids anstelle des gfp das entsprechende Transferkonstrukt (Gag-HIV), das auch für eine Kanamycinresistenz codiert, eingebracht. Aus den entstandenen positiven kanamycinresistenten Klonen wurde die Kanamycinresistenz-Kassette aus dem rekombinanten BAC wieder entfernt. Dieses rekombinante BAC enthält damit lediglich das gewünschte Transgen (C-syngagpolnef). Schließlich wurden eukaryontische Zellen mit dem rekombinanten EHV-Bacmid transfiziert. In den transfizierten Zellen wurde Virus produziert.³¹

2.1.2 New York Vakzinia Virus – HIV-C/HIV-B

Die Vakzine NYVAC-C beziehungsweise NYVAC-B ist ein rekombinanter Vektor, der die antigenen Proteine gag, pol, env und nef des HIV-Subtyps C beziehungsweise B exprimiert. Der Impfstoff wurde von Sanofi Pasteur (früher Aventis Pasteur, Lyon, Frankreich) entwickelt und für die Arbeit zur Verfügung gestellt. Das dafür notwendige Donorplasmid wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Hans Wolf und Prof. Ralf Wagner hergestellt. Es enthält das HIV-I-C (bzw. HIV-I-B) gp120 Hüllprotein und die Proteine gag, pol, nef, sowie zwei synthetische Promotoren mit entgegengesetzten Orientierungen und wird an die Stelle der Thymidinkinase in das NYVAC eingebracht, um eine Selektionierung auf dieses Merkmal zu ermöglichen. CEF Zellen (embryonale Hühnerfibroblasten) werden gleichzeitig mit dem Donor Plasmid transfiziert und mit NYVAC (New York Vaccinia Virus, attenuiertes

rekombinantes Pockenvirus, durch selektierte Deletion von 18 viralen Genen aus dem Vaccinia Virus Copenhagen Strain generiert³²⁾ infiziert.³³

2.2 Zellkulturtechniken

2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Sofern in den verschiedenen Versuchen die Zellzahl bestimmt wurde, wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Aus der jeweiligen Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und mit 90 µl Farblösung (0,5% Trypanblau-Lösung) verdünnt. Bei toten Zellen kann der Farbstoff durch die Zellmembran dringen. Somit können lebende von toten Zellen unterschieden werden³³

2.2.2 Kultivierung von MRC-5-Zellen

Die fibroblastenähnlichen MRC-5-Zellen (fötale Lungengewebezellen) wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zweimal bis dreimal pro Woche wurde die Zelllinie 1:2 bis 1:4 gesplittet. Als Medium wurde Dullbeccos's Modified Eagle medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) (PAN biotech®, Aidenbach), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verwendet.

2.2.3 Fibrozytengenerierung aus CD14⁺ Zellen

Die Fibrozytengenerierung wurde in vorliegender Arbeit neu etabliert. Nach verschiedenen Versuchen (siehe Ergebnisteil 3.5) wurde nach folgendem Protokoll standardmäßig vorgegangen.

Zur Fibrozytengenerierung wurden nach der Isolierung von PBMCs, wie unter 2.3.1 beschrieben, CD14⁺ Zellen mittels MACS®, wie unter 2.3.2 beschrieben, gewonnen. Diese wurden in einer Konzentration von 5·10⁵ CD14⁺ pro well in 500 µl Fibrocytenmedium (DMEM und 20% FKS) auf einer 24-well-Platte ausgesät. Anschließend wurde diese bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank für 13 bis 14 Tage kultiviert. Täglich wurde die Morphologie beurteilt und die well-Platten wurden vorsichtig geschwenkt, so dass sich die Zellen nicht nur am Rand des wells anlagerten, sondern auch in der Mitte. Wichtig war, dass in der gesamten Reifungszeit kein Mediumswechsel vorgenommen wurde.

2.2.4 Einfrieren von PBMCs

Die PBMCs wurden auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml in R10-Medium (RPMI + 10% FKS + 1% PSN) Medium eingestellt. In der gewünschten Konzentration wurden die PBMCs auf 4°C heruntergekühlt. 0,5 ml des Freezing Mediums (15% RPMI, 70% FBS, 15% DMSO) wurden jeweils in spezielle Fläschchen (cryo vials) auf Eis vorgelegt und mit 0,5 ml der PBMC-Zellsuspension (= 1×10^7 Zellen) aufgefüllt. Dann wurden PBMCs über 15-20 Stunden kontrolliert auf -80°C abgekühlt und in Stickstofftanks gelagert.

2.2.5 Auftauen von PBMCs

Als Vorbereitung wurden 50 ml Falcons mit 15 ml R20-Medium (RPMI + 20% FKS + 1xPSN) auf 37°C erwärmt. In die Fläschchen mit den getauten PBMCs wurde 1 ml warmes R20-Medium dazugegeben. Ein Teil der getauten Zellen wurde durch vorsichtiges Mischen mit der Pipette gelöst und in die 50 ml Falcons gegeben. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis alle Zellen aufgetaut waren. Nach Zentrifugation bei $677 \times g$ bei Raumtemperatur für 10 Minuten wurde das Pellet in R10-Medium gelöst. Daraufhin folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei $677 \times g$ bei Raumtemperatur für 10 Minuten. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml DC-Medium resuspendiert und die Zellen gezählt.

2.3 Isolierung und Aufreinigung von Primärzellen

2.3.1 Isolierung von PBMCs (peripher blood mononuclear cells) aus Buffy Coat oder Vollblut

Um aus Buffy Coat (Blutkonserven) PBMCs (peripher blood mononuclear cells) zu isolieren, wurde jeweils 12,5 ml Blut in ein Falcon Tube gegeben, mit P2 (PBS, 2% FKS) auf 35 ml aufgefüllt und durch leichtes Schwenken vermischt. Daneben wurden PBMC Separation Falcon Tubes vorbereitet, in die jeweils 15 ml Ficoll zugegeben wurden. Diese Separation Tubes wurden dann bei Raumtemperatur und $300 \times g$ 1 Minute zentrifugiert, so dass sich die Ficollschicht unter der permeablen Trennscheibe des Separation Tube befand. Das mit P2 verdünnte Blut wurde dann maximal bis zur 50 ml Markierung auf die Trennscheibe der Separation Falcon Tubes gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur und $1000 \times g$ ungebremst zentrifugiert. Aufgrund der Dichteunterschiede zwischen den PBMCs und den

restlichen Blutbestandteilen konnte das Blut so in einzelne Schichten getrennt werden. Nach der Zentrifugation befanden sich unter der Trennscheibe Erythrozyten, Granulozyten und ein Teil des Separationsmediums, darüber Plasma und das restliche Separationsmedium. Dazwischen bildete sich eine weißliche ringförmige Schicht aus, die die gewünschten PBMCs und Thrombozyten enthielt. Nach Absaugen des Plasmas wurde die Schicht mit den PBMCs vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Falcon Tube überführt. Das Falcon Tube wurde mit P2 auf 50 ml aufgefüllt, leicht geschwenkt und 10 Minuten bei 5°C und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde samt dem weißen Ring bestehend aus Thrombozyten abgesaugt, ohne dabei die PBMCs mit abzusaugen. Um eine Verunreinigung mit Thrombozyten zu minimieren wurde das verbleibende Zellpellet (PBMCs) mit P2 gelöst, das Falcon Tube erneut mit P2 auf 50 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 5°C und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 1 ml DC-Medium gelöst und die Anzahl der gewonnenen PBMCs in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.³³

2.3.2 Generierung von MDDC (monocyte derived dendritic cells) aus Monozyten (CD14⁺ Zellen)

Diese Methode unterteilt sich in die Gewinnung von Monozyten (CD14⁺ Zellen) aus PBMCs und die anschließenden Kultivierung der CD14⁺ Zellen zu immaturren MDDCs (monocyte derived dendritic cells).

Die Isolierung von CD14⁺ Zellen erfolgte mittels Magnetic Cell Separation (MACS[®]). Dabei werden bestimmte Zellen anhand ihrer bestimmten Oberflächenstrukturen aus einem Zellgemisch abgetrennt. In diesem Fall wurden CD14 Micro Beads (Miltenyi Biotec[®]) verwendet, die spezifisch CD14⁺ Zellen (Monozyten) binden. Dafür wurden 1·10⁸ PBMCs in ein 15 ml Falcon überführt und 10 Minuten bei 5°C und 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 800 µl MACS[®]-Puffer gelöst. Dazu wurden 200 µl CD14 Micro Beads gegeben, mit der Lösung gut vermischt und für 15 Minuten bei 5°C im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde das Falcon Tube mit dem zehnfachen Volumen an MACS[®]-Puffer aufgefüllt und für 10 Minuten bei 5°C und 300 x g zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl MACS[®]-Puffer gelöst. Zur Vorbereitung der Separation wurden MS Säulen (Miltenyi Biotec[®]) in den Magneten (MiniMACS Magnet[®], Miltenyi Biotec[®]) eingesetzt und mit 500 µl MACS[®]-Puffer äquilibriert. Nachdem der MACS[®]-Puffer vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde die Zellsuspension bestehend aus PBMCs und den gebundenen CD14 Micro Beads auf die Säule gegeben.

Anschließend wurde die Säule dreimal hintereinander mit jeweils 500 µl MACS[®]-Puffer gewaschen, um alle nicht gebundenen Zellen von der Säule zu entfernen. Dann wurde die Säule aus dem Magnetfeld entnommen und in ein neues 15 ml Falcon Tube gestellt. Um die im Magnetfeld gebundenen CD14⁺ Zellen von der Säule zu spülen, wurde 1 ml MACS[®]-Puffer auf die Säule gegeben und mit einem Stempel sofort durch die Säule gedrückt. Im Falcon verblieben dann die von der Säule gewaschenen CD14⁺ Zellen (Monozyten). Diese wurden 10 Minuten bei 5°C und 300 x g zentrifugiert.

Um die CD14⁺ Zellen zu immaturren MDDCs zu kultivieren, wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml DC-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden ausgezählt und mit DC-Medium auf $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Unter Zugabe von Interleukin-4 und GM-CSF, jeweils in einer Konzentration von 500 U/ml. Dabei wurden ca. $20 \cdot 10^6$ Zellen in eine 75 cm² Zellkulturflasche gegeben. Dadurch reiften die Zellen innerhalb von fünf Tagen zu immaturren MDDCs heran. Nach den ersten drei Tagen wurde das Medium gewechselt und die Zytokine wurden erneuert.³³

2.4 Versuche zur Bestimmung des *Cross Priming* Potentials von MDDCs

Die MDDCs wurden auf drei verschiedenen Arten hinsichtlich ihres *Cross Priming* Potentials untersucht: Einen großen Teil bildete die FACS-Analyse der Oberflächenmarkerexpression der MDDCs nach Stimulation mit dem Überstand von vorher virusinfizierten Zellen. Teilweise jeweils alternativ und parallel dazu wurde in einigen Versuchen eine Stimulation durch eine Co-Kultur der MDDCs mit den virusinfizierten Zellen in Transwells erreicht. Nach der Stimulation wurde in diesen Versuchsansätzen zusätzlich mit einem ELISA der Zytokingehalt in diesen Versuchsansätzen bestimmt. Schließlich wurde nach Inkubation der vorher stimulierten MDDCs mit CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, die bereits Kontakt mit dem HI-Virus hatten, deren Interferon-γ Sekretion im Elispot untersucht.

Zur ersten Orientierung wurden virusinfizierte MRC-5 Zellen für die Stimulation der MDDCs verwendet, die dann im Verlauf der Versuchsreihen durch autologe PBMCs, CD14⁺ Zellen oder autologe Fibrozyten ersetzt wurden.

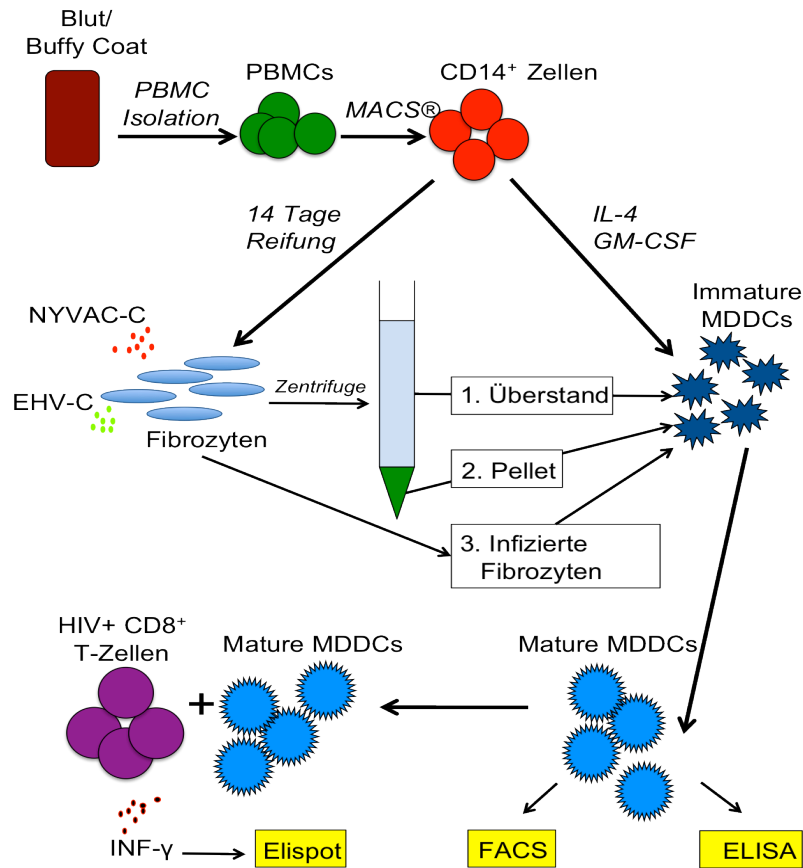


Abbildung 2.1
Cross Priming Versuchsanordnung

2.4.1 Infektion der verschiedenen Zellen

Zur Infektion wurden die MRC-5 Zellen mit $1 \cdot 10^5$ Zellen in 0,5 ml DMEM pro well auf einer 24-well-Platte verteilt. Bei 37°C und 5% CO₂ wurden diese MRC-5-Zellen für 18-20 Stunden im Brutschrank kultiviert, so dass sie am Boden des Wells festwuchsen und in dieser Form infiziert werden konnten. Vor der Infektion wurde das Medium aus den wells abgesaugt und durch 200 µl frisches Medium ersetzt. Die MRC-5-Zellen wurden dann mit NYVAC-C (10 µl/ $1 \cdot 10^5$ Zellen) oder EHV-C (MOI 10) infiziert und unmittelbar danach für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die wells von überschüssigem Virus gereinigt, indem das Medium in den wells abgesaugt, das well mit PBS gewaschen und 200 µl frisches Medium (DMEM) dazugegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ konnte der Ansatz weiter für die Stimulation der MDDCs verwendet werden.

Im Versuch mit autologen PBMCs und CD14⁺ erfolgte die Bereitstellung der Zellen wie unter 2.3 beschrieben, jedoch wurden die gewünschten Zellen sofort nach ihrer Gewinnung bei -80°C in Stickstoff weggefroren. Dadurch konnte beim gesamten Versuchsansatz im

autologen System gearbeitet werden, das heißt die infizierten PBMCs oder CD14⁺, die zur Stimulation der MDDCs verwendet wurden, stammten aus demselben Blut wie die inzwischen aufbereiteten MDDCs. Nachdem die eingefrorenen PBMCs oder CD14⁺ zur Infektion wieder aufgetaut worden waren, konnten sie in einer 24-well-Platte mit $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well in 0,5 ml DC-Medium und einer MOI 10 infiziert werden. Die infizierten Zellen wurden 60 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Virus aus dem Ansatz gewegewaschen, indem die Zellsuspension aus den Wells zentrifugiert wurde, das Pellet mit PBS gelöst und nochmals zentrifugiert wurde. Schließlich wurde das jetzt verbleibende Pellet mit 0,5 ml frischem DC-Medium gelöst und wieder in die Wells überführt. Dann wurde die well-Platte mit den infizierten Zellen bis zur Stimulation der MDDCs für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die autologen Fibrozyten wurden wie in 2.2.4 in einer 24-Well-Platte generiert. In den Wells, in denen die Fibrozyten mikroskopisch am besten gewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt und durch 200 µl frisches Fibrozyten-Medium (DMEM + 20 % FKS) ersetzt. Die Infektion mit EHV-C und NYVAC-C wurde mit $2 \cdot 10^5$ Zellen und einer MOI 10 durchgeführt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das Virus von den Zellen gewaschen, indem das Medium abgesaugt wurde, PBS in die Wells gegeben und ebenfalls abgesaugt wurde. Dann wurde 400 µl frisches Fibrozyten-Medium zugegeben und der Ansatz für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

In den Transwell-Experimenten wurden die zu infizierenden Zellen in den Transwells ausgesät, $1 \cdot 10^5$ MRC-5-Zellen pro Transwell, $2 \cdot 10^5$ PBMCs oder CD14⁺ Zellen pro Transwell. Zur Infektion wurde das Medium in den Transwell abgesaugt und bei den MRC-5-Zellen durch 500 µl frisches Medium ersetzt. Die Zellen in den Transwells wurden nun mit EHV-C und NYVAC-C mit einer MOI 10 infiziert. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das Medium in den Transwells abgesaugt und die Transwells wurden einmal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden zu den Transwell wieder 500 µl frisches Medium gegeben und dieser Ansatz 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die PBMCs oder CD14⁺ Zellen wurden ohne Mediumswechsel mit EHV-C und NYVAC-C mit einer MOI 10 infiziert. Nach 60 Minuten wurde das Virus gewegewaschen, indem der Inhalt aus den Transwells entfernt wurde, abzentrifugiert, erneut mit PBS gelöst und nochmals abzentrifugiert wurde. Das Pellet wurde mit 0,5 ml DC-Medium gelöst und in das jeweilige Transwell zurückgegeben, das aber jetzt in ein neues Wells gesetzt wurde. Die Transwells wurden dann bei 37°C und 5 % CO₂ für 24 Stunden inkubiert.

2.4.2 Stimulation von MDDCs mit dem Überstand aus virusinfizierten Zellen

Um das *Cross Priming* Potential von MDDCs zu untersuchen, wurde der Überstand von Zellen, die vorher mit EHV-C oder NYVAC-C infiziert worden waren, zur Stimulation der immaturen MDDCs verwendet.

Sofern es sich um MRC-5-Zellen handelte wurde der Überstand im well 24 Stunden nach der Infektion vorsichtig aus dem well entnommen und fünf Minuten mit 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde wiederum in die wells einer 24-well-Platte pipettiert, wobei jeweils $5 \cdot 10^5$ iMDDCs in 500 µl DC-Medium gegeben wurden. Die entstandene Zellsuspension wurde dann je nach Versuch für 12 Stunden, 24 Stunden oder 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die PBMCs oder CD14⁺ Zellen wurden 24 Stunden nach der Infektion aus den wells entnommen und bei Raumtemperatur für fünf Minuten mit 300 x g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde zusammen mit $5 \cdot 10^5$ MDDCs in 500 µl DC-Medium bei 37°C und 5 % CO₂ für 24 oder 48 Stunden inkubiert.

Bei Verwendung von autologen Fibrozyten wurde auch hier der Überstand 12 Stunden nach der Infektion vorsichtig aus dem Well entnommen und bei Raumtemperatur für fünf Minuten mit 500 x g zentrifugiert. Die Überstände (ca. 400 µl) wurden zusammen mit $5 \cdot 10^5$ iMDDCs in 0,5 ml Medium jeweils in eine 24-Well-Platte pipettiert und bei 37°C und 5 % CO₂ für 24 oder 48 Stunden inkubiert.

Ungeachtet, welche Zellen für die Stimulation der iMDDCs benutzt wurden, wurde als Positivkontrolle LPS verwendet, wobei 4 µl 1:10 verdünntes LPS direkt zu $5 \cdot 10^5$ iMDDCs in 0,5 ml DC-Medium gegeben wurde. Als Negativkontrolle wurde zunächst der Überstand von nicht infizierter Zellen genommen. Zusätzlich wurde im Verlauf der Versuchsreihen eine zweite Negativkontrolle gewählt. Sie setzte sich nur aus dem entsprechendem Medium, mit dem die infizierten Zellen behandelt wurden, und den iMDDCs zusammen.

Nach der vorgegebenen Inkubationszeit wurden die jetzt maturen MDDCs aus den wells entnommen. Dabei wurden sie in ihrem Medium hin und her pipettiert und schließlich vom Boden der wells vorsichtig mit der Pipettenspitze abgekratzt wurden. Die mMDDCs wurden in FACS-Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 5°C und mit 300 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden entnommen und bei -80°C eingefroren, um spätere Zytokinanalysen durchführen zu können. Das verbleibende Zellpellet, die mMDDCs, wurden in 500 µl FACS-Puffer gelöst und die Oberflächenmarkerexpression nach entsprechender FACS-Färbung bestimmt.

2.4.3 Stimulation von MDDCs mittels virusinfizierter Zellen durch Co-Kultur in Transwells

Um die iMDDCs mit den infizierten Zellen in Co-Kultur zu bringen, wurden 24 Stunden nach der Infektion $1 \cdot 10^5$ iMDDCs in 0,5 ml DC-Medium in die wells gegeben, in denen die Transwells mit den infizierten Zellen hingen. Dieser Ansatz wurde zur Stimulation der iMDDCs wurde 24 oder 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Analog zu 2.4.2 wurden als Positivkontrolle mit LPS stimulierte iMDDCs benutzt. Als Negativkontrollen dienten nicht infizierte Zellen in Transwells und analog zu 2.4.2 nur das entsprechende Medium, mit dem die infizierten Zellen behandelt wurden, zusammen mit iMDDCs.

Nach der vorgegebenen Inkubationszeit wurden die jetzt maturen MDDCs wie unter 2.4.2 beschrieben zur FACS-Analyse vorbereitet.

2.4.4 Cross Priming von T-Zellen durch MDDCs, die vorher durch den Überstand virusinfizierter autologer Fibrozyten stimuliert wurden

Um die jeweils 100.000 T-Zellen zu primen, wurden entweder mit EHV-B oder NYVAC-B direkt infizierte MDDCs eingesetzt, oder MDDCs, die zuvor mit dem Überstand infizierter autologer Fibrozyten stimuliert wurden. Zusätzlich wurde das Pellet aus der Überstandsgewinnung dazu verwendet, die MDDCs unter der Hypothese zu stimulieren, dass sich darin Virus- und Fibrozytenzellreste befinden. Daneben kamen zur Stimulation von MDDCs auch virusinfizierte Zellen ohne Trennung durch Zentrifugation in Pellet und Überstand zum Einsatz. Die Fibrozyten wurden mit EHV-B oder NYVAC-B analog zur Fibrozyteninfektion in 2.4.1 infiziert. Danach wurde ihr Überstand, das Pellet oder die infizierten Zellen direkt dazu verwendet, die MDDCs zu stimulieren. Dabei wurde das restliche Virus in den Ansätzen vor der Stimulation der MDDCs durch UV-Strahlung $6 \times 0,12$ J/cm² inaktiviert.

Schließlich wurden $1 \cdot 10^5$ HIV+ CD8⁺ zytotoxische T-Zellen mit den stimulierten MDDCs in einer Ratio von 1:1 inkubiert. Die CD8⁺ zytotoxische T-Zellen hatten bereits vorher mit HIV-Epitopen Kontakt. Im Versuch sollten diese HLA kompatiblen T-Zellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor ein spezifisches Epitop, das durch die vorher stimulierten und maturierten MDDCs präsentiert wurde, erkennen und mit einer Interferon- γ -Produktion reagieren. Die Menge an Interferon- γ wurde mit einem Elispot analysiert.

2.4.5 Direkte Stimulation der MDDCs mit EHV-B/C oder NYVAC-B/C

Zur direkten Stimulation der MDDCs mit EHV-B oder NYVAC-B beziehungsweise EHV-C oder NYVAC-C wurden $5 \cdot 10^5$ MDDCs in verschiedener MOI infiziert. Daraufhin wurden die infizierten MDDCs 24 Stunden stimuliert. Die Oberflächenmarkerbestimmung erfolgte mittels FACS-Analyse.

2.5 FACS-Analysen

FACS steht als Akronym für Fluorescence activated cell sorting und wird auch synonym zu Durchflusszytometrie verwendet, ist jedoch eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson® (BD®). Mittels FACS bzw. Durchflusszytometrie sind zwei Verfahren möglich: zum einen die Sortierung von verschiedenen Zellarten und zum anderen die Quantifizierung der Zellen durch ihr Streulicht- oder Fluoreszenzverhalten. Dabei fließen die Zellen hintereinander durch eine dünne Messkammer und werden von der Seite von einem Laserlicht angestrahlt.

Bei einer Streulichtmessung wird das Streulicht gemessen, das die den Laserstrahl kreuzenden Zellen verursachen. Je nachdem in welchem Winkel das gestreute Licht gemessen wird, handelt es sich um ein Vorwärts- und ein Seitwärtsstreulicht. Das Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter) wird in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls von einem Detektor gemessen und steht vor allem im Verhältnis zur Größe einer Zelle. Kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulicht, große Zellen ein großes. Das Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter) wird etwa im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl gemessen und steht vor allem im Verhältnis zum Inhalt einer Zelle. Mit der Anzahl der Lysosomen oder mit der lichtmikroskopischen Granularität einer Zelle steigt das erzeugte Seitwärtsstreulicht proportional an. Zur grafischen Darstellung werden die Messergebnisse in einem sogenannten Dot-Plot-Diagramm auf einem Koordinatensystem abgebildet. Auf der Abszisse wird das Vorwärts- und auf der Ordinate das Seitwärtsstreulicht aufgetragen, wobei jeder Punkt einer Zelle entspricht.

Eine Fluoreszenzmessung kann durchgeführt werden, wenn bestimmte Merkmale einer Zelle, in der Regel verschiedene Oberflächenmarker, mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert werden. Durchquert eine so markierte Zelle den Laserstrahl, entsendet sie ein Fluoreszenzsignal, das von einem Detektor gemessen wird. Üblicherweise werden zwei bis vier verschiedene Farbstoffe zur Markierung und gleichzeitigen Messung verwendet. Bei der

Verwendung von zwei oder mehr Fluoreszenzfarben müssen die einzelnen Farben gegeneinander kompensiert werden, da die Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzsignale zwar unterschiedlich sind, sich aber teilweise überlagern und so das Ergebnis verfälscht würde.³⁴

2.5.1 FACS-Färbung verschiedener Oberflächenmarker von MDDCs

Die Maturation von MDDCs, welche wie unter 2.4 beschrieben stimuliert wurden, wurde an Hand ihrer Oberflächenmarkerexpression bestimmt. Folgende Oberflächenmarker wurden mit einem fluoreszierendem Antikörper gefärbt: CD80, CD 83, HLA-DR, CD 86, CD 40, CCR7. Dazu wurden die MDDCs nach der vorgegebenen Stimulationszeit aus den Wells mit einer Pipette aus den wells entnommen, unter vorsichtigem Abkratzen der Zellen, die am Wellboden anhafteten. Die MDDCs wurden in FACS-Röhrchen (Sarstedt®) überführt und fünf Minuten bei 300 x g und 4°C abzentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1,5 ml FACS-Puffer resuspendiert. Danach folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei 300 x g und 4°C. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 100 µl FACS-Puffer gelöst. Dazu wurde der entsprechende Antikörper in einer Konzentration von 1: 100 gegeben und der Ansatz 30 Minuten auf Eis in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden überschüssige Antikörper aus der Lösung gewegewaschen, indem 1,5 ml FACS-Puffer zugegeben und für fünf Minuten bei 4°C und 300 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 µl FACS-Puffer gelöst und vor Licht geschützt. Die FACS-Analyse erfolgte am FACS-Gerät (Beckman Coulter®; Epics XL.MCL).

2.5.2 Intrazellulärer GagPolNef Nachweis mittels p24-FACS-Analyse

Zum intrazellulären GagPolNef Nachweis mittels p24-Antigen-FACS-Färbung und Analyse wurden die PBMCs, die mit EHV-C und NYVAC-C mit einer MOI 10 infiziert wurden, als Pellet in FACS-Röhrchen (Sarstedt®) vorgelegt und für fünf Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet wieder in 1 ml FACS-Puffer gelöst, für fünf Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Die Zellen wurden in 100 µl FACS-Puffer gelöst. Hinzu kamen 2 µl Fc-Rezeptorblocker (MACS®). Anschließend wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Erneut wurde 1 ml FACS-Puffer zugegeben, die Zellen für 5 Minuten bei 300 x g

und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um Löcher in der Zellwand zu erzeugen und damit das Eindringen des Antikörpers in die Zelle zu ermöglichen, wurden die Zellen für 20 Minuten mit 250 µl Cytofix/Cytoperm (4 % PFA, 1 % Saponin in PBS) bei 5°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit Perm/Wash (0,1 % Saponin PBS) gewaschen. Dazu wurden 500 µl Perm/Wash zu den Zellen gegeben und bei 500 x g für 5 Minuten bei 5°C zentrifugiert.

Das Pellet wurde für die intrazelluläre p24-Färbung mit 100 µl Perm/Wash und 0,5 µl p24-Antikörper (Beckman Coulter®; PE-gekoppelt) gelöst und für 25 Minuten bei 5°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluß daran wurde erneut zweimal mit Perm/Wash gewaschen und das Pellet in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die FACS-Analyse erfolgte am FACS-Gerät (Beckman Coulter®; Epics XL.MCL).³³

2.5.3 Charakterisierung von humanen Fibrozyten mittels indirekter anti-Collagen I FACS-Analyse

Die CD14⁺ Zellen wurden wie in 2.2.4 beschrieben in einer 25 cm² großen Zellkulturflasche generiert. Die am Boden haftenden fibrozytenähnlichen Zellen wurden mit einem Zellschaber vorsichtig abgelöst und mit einer Plastikpipette aus der Zellkulturflasche entnommen. Die Zellen wurden für fünf Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml FACS-Puffer gelöst. Dieser Ansatz wurde mit jeweils 0,5 ml auf 4 FACS-Röhrchen verteilt. Zur indirekten FACS-Analyse wurde ein Röhrchen zuerst mit anti-Collagen-I-Antikörper (1. Antikörper) und danach mit anti-IgG FITC-gekoppelten Antikörper (2. Antikörper) behandelt. Als Kontrollen wurden Zellen nur mit dem 1. Antikörper, nur mit dem 2. Antikörper und ohne irgendeinen Antikörper verwendet. Für die Antikörper-Färbung wurden die Zellen für fünf Minuten bei 300 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1,5 ml FACS-Puffer resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei 300 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl FACS-Puffer gelöst. Zu diesem Ansatz wurden, wenn vorgesehen, jeweils 5 µl des humanen anti-Collagen-I-Antikörpers (Chemikon®) pipettiert und die Zellen mit dem Antikörper für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach wurde durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 300 x g und 4°C überschüssiger Antikörper gewegewaschen. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl FACS-Puffer gelöst und, wenn vorgesehen, wurden 2 µl des anti-IgG Antikörpers (FITC-gekoppelt) dazupipettiert. Inkubation und Waschschrift erfolgte wie beim anti-Collagen-I-Antikörper.

Das Pellet wurde in 500 µl gelöst und die FACS-Analyse erfolgte am FACS-Gerät (Beckman Coulter®; Epics XL.MCL).

2.6 Zytokin-ELISA

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Dabei binden spezifische enzymmarkierte Antikörper den nachzuweisenden Stoff, der an einer mit coating-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte gebunden hat. Ein zugegebenes Substrat wird vom Enzym umgesetzt, was als Farbumschlag nachgewiesen werden kann.

Zunächst wurden 100 µl des capture antibody (BD Biosciences®, OptEIA™ Set Human IL-6, IL-10, IL-12, TNF) mit einer 1:250 Verdünnung in coating buffer (0,1 M Natriumkarbonat; 8,4 g NaHCO₃; 3,56 g Na₂CO₃ in 1,0 Liter; pH 9,5) für die Beschichtung der 96-well-Mikrotiterplatten (NUNC Maxi Sorb® Platten) gelöst. Die Platten wurden mit einer Folie versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Antikörperlösung in den wells verworfen und die wells dreimal mit mindestens 300 µl wash buffer pro Well (PBS mit 0,05 % Tween®) gewaschen. Dabei wurden die Platten auf Papierhandtücher geklopft, um Pufferreste sorgfältig zu entfernen. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten mit mindestens 200 µl assay diluent (PBS mit 10% FKS; pH 7) pro well abgeblockt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Hierauf folgte ein zweiter Waschschriff dreimal mit wash buffer. Währenddessen wurden die Standards und die Proben in den jeweiligen Verdünnungen mit assay diluent vorbereitet. Als Probe wurden die jeweiligen Überstände verwendet, nachdem die MDCCs in der beschriebenen Weise stimuliert worden waren. Dazu wurden 125 µl Überstand auf vier Zytokinmessungen aufgeteilt, so dass pro well 30 µl zur Verfügung standen. Um pro well 100 µl einsetzen zu können, wurde die 30 µl Stammlösung 1:4 mit assay diluent verdünnt. Von der 1:4 verdünnten Lösung wurden 22nochmal jeweils 1:10 verdünnte Lösungen hergestellt, um parallel dazu im ELISA gemessen zu werden. Die Standards wurden nach Protokoll von BD Biosciences®, OptEIA™ Set Human IL-6, IL-10, IL-12, TNF angefertigt. Von der jeweiligen Standardverdünnung von den jeweiligen Proben wurden in jedes well 100 µl pipettiert, die Platten wieder mit einer Folie versiegelt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten fünfmal mit wash buffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl detection antibody (BD Biosciences®, OptEIA™ Set Human IL-6, IL-10, IL-12, TNF) in einer Verdünnung von 1:250 oder für IL-10 in einer Verdünnung von 1:500 in jedes well pipettiert. Die Platte wurde versiegelt und für

eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperlösung wurde verworfen und die Platte siebenmal mit wash buffer gewaschen. Dann wurden 100 µl substrate solution (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid; BD Biosciences[®], BD Biosciences[™] TMB Substrate Reagent Set) in die wells pipettiert und die well-Platten für ein paar Minuten inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden jedem well 50 µl stop solution (0,5 M H₂SO₄) hinzugefügt. Zum Schluß wurde die Absorption in jedem well bei 450 nm photometrisch gemessen.³³

2.7 Interferon-γ-Elispot

Zur Vorbereitung der 96-well-Mikrotiterplatten für den Elispot (Millipore MAIPS45, PVDF 96-well-Platte) wurden in jedes well 100 µl coating solution bestehend aus monoklonalem anti-human Interferon-γ Antikörper (Mab Tech clone 1-D1K 1mg/ml) in einer 1:100 Verdünnung mit PBS (Sterile Dulbeccos PBS, Sigma Aldrich[®]) pipettiert. Dann wurde die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert (15-24 Stunden). Anschließend wurden die Platten in eine Desinfektionslösung (4% bleach) entleert. Die Platten wurden viermal gewaschen, indem jedem well 200 µl steriles PBS zugesetzt und wieder entnommen wurden. Daraufhin wurden 200 µl R10-Medium (RPMI + 10% FKS + 1% PSN) in jedes well gegeben, die Platte bedeckt und für mindestens zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Wieder wurde die Platte in 4% bleach-Lösung entleert. Nun wurden 1·10⁵ T-Zellen in 100 µl R10-Medium in je ein well pipettiert. 1·10⁵ MDDCs, die vorher auf verschiedene Art und Weise stimuliert waren, wurden ebenfalls in 100 µl R10-Medium hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurde das Peptid SLYNTVATL, ein für T-Zellen HIV-spezifisches antigen wirkendes Epitop³⁵, und Staphylococcus Endotoxin gelöst in 100 µl R10-Medium zu den T-Zellen gegeben. Als Negativkontrolle fungierten nicht stimulierte MDDCs in 100 µl R10. Die Platten wurden bedeckt und bei 37°C und 5% CO₂ für 16 bis 18 Stunden inkubiert. Kurz bevor die Inkubationszeit endete, wurde das biotinylierte mouse anti-human IFN-γ Reagenz (biotinylated mouse anti human IFN-γ monoclonal antibody, Vector Laboratories[®]) vorbereitet, indem der Stock 1:1000 in sterilem PBS 0,5% FKS verdünnt wurde. Nachdem die wells in 6% bleach entleert wurden, folgten sieben Waschschrte mit jeweils 250 µl Waschlösung (PBS und 0,05% Tween[®] 20 Sigma[®]) pro well. Die Platte wurde auf einem Papierhandtuch trocken geklopft, pro well wurden 100 µl des vorbereiteten biotinylierten Antikörpers pipettiert und die bedeckte Platte wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde der mit alkalischer Phosphatase

konjugierte anti-biotin Antikörper (Vector Laboratories[®]) 1:750 mit assay diluent (steriles PBS 0,5% bovine serum albumin, Sigma[®]) verdünnt. Die Platten wurden in 6% bleach-Lösung entleert und siebenmal mit 250 µl Waschlösung (PBS und 0,05% Tween[®] 20 Sigma[®]) gewaschen. Danach wurden sie auf Papierhandtüchern trocken geklopft. In jedes well wurden 100 µl des vorher verdünnten, mit Phosphatase konjugierten anti-biotin Antikörper gegeben und die Platten wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde viermal mit Waschlösung gewaschen und wieder trocken geklopft. Daraufhin wurden 100 µl BCIP/NBT Substrat Lösung (Pierce[®]) in jedes well pipettiert, die wells mit einem Deckel verschlossen und für 5 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis dunkle spots im well der Positivkontrolle erschienen. Die Platte wurde in 4% bleach-Lösung entleert und die wells wurden dreimal mit 200 µl destilliertem Wasser pro well gespült. Nach Trocknung der well-Böden bei Raumtemperatur wurde die Platte mittels Elispot-Reader ausgelesen.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde das *Cross Priming* Potential von EHV-C und NYVAC-C auf MDDCs untersucht. Zusätzlich erfolgte auch ein direkter Vergleich zwischen den beiden Vektorsystemen. Zunächst musste ein geeignetes *in vitro* Modell entworfen werden. Diese Aufgabe bildet einen essentiellen Bestandteil dieser Arbeit.

Einen Großteil der Untersuchungen stellt die FACS-Analyse der Oberflächenmarkerexpression von MDDCs dar. Dies geschieht unter der Hypothese, dass die Hochregulierung spezifischer Oberflächenmarker eine Maturation von MDDCs kennzeichnet und genau diese maturierten MDDCs in der Lage sind zytotoxische T-Zellen zu aktivieren. Ergänzend wurden Zytokinanalysen der maturierten MDDCs durchgeführt und das *Cross Priming* nachgewiesen, indem bereits maturierte MDDCs in Co-Kultur mit HIV+ CD8+T-Zellen gebracht wurden.

3.1. FACS-Analyse der Oberflächenmarkerexpression von MDDCs, die vorher durch virusinfizierte MRC-5-Zellen stimuliert wurden

Für ein geeignetes *in vitro* Modell zur Untersuchung des *Cross Priming* Potentials von MDDCs wurden zunächst MRC-5-Zellen mit EHV-C oder NYVAC-C infiziert und deren Überstand wurde nach 12 Stunden Inkubation zur Stimulation der MDDCs verwendet. Alternativ wurden die MRC-5-Zellen in Transwells infiziert und diese dann zu den MDDCs gegeben. Mittels FACS-Analyse wurde die Oberflächenmarkerexpression der stimulierten MDDCs untersucht.

3.1.1 Stimulation der MDDCs durch den Überstand virusinfizierter MRC-5-Zellen

Mittels FACS-Analyse wurde die Oberflächenmarkerexpression von CD80, CD83, HLA-DR, CD86, CD40 und CCR7 gemessen. Dies nach der Inkubation für 24 Stunden mit dem Überstand infizierter MRC-5 Zellen, die ihrerseits für 1 Stunde infiziert und nach Entfernen der Infektionslösung für 24 Stunden inkubiert wurden.

Dabei zeigte sich eine Hochregulierung von CD80 durch die Verwendung von Überstand EHV-C infizierter, NYVAC-C infizierter und nicht infizierter MRC-5 Zellen auf über 90%. Die immaturen MDDCs hatten eine CD80 Expression von 30,95%.

Der Oberflächenmarker CD83 wurde auf MDDCs weder durch die Stimulation mit Überstand EHV-C/NYVAC-C infizierter MRC-5 Zellen noch mit LPS oder auch nicht infiziertem Überstand MRC-5 Zellen über 7,75% hochreguliert.

Die HLA-DR Expression auf MDDCs war ähnlich wie bei CD80 durch Stimulation mit dem Überstand infizierter EHV-C/NYVAC-C MRC-5 Zellen und dem Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen um die 95%.

Bei CD86 wurde eine Hochregulierung von 66,72% durch den EHV-C Überstand gemessen, 62,55% durch den NYVAC-C Überstand, 58,21% durch den Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen und 64,66% durch LPS.

Durch den EHV-C Überstand wurde CD40 auf den MDDCs auf 39,74% hochreguliert, durch den NYVAC-C Überstand 54,29% und durch nicht infizierten MRC-5 Überstand 35,14%.

CCR7 wurde durch den Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen am meisten hochreguliert, durch EHV-C- und NYVAC-C-Überstand 4,95% bzw. 6,83%.

Als Positivkontrolle wurde bei allen Oberflächenmarkern LPS verwendet. Verglichen wurde die Oberflächenmarkerexpression insgesamt mit der Expression auf immaturren MDDCs vor der Stimulation.

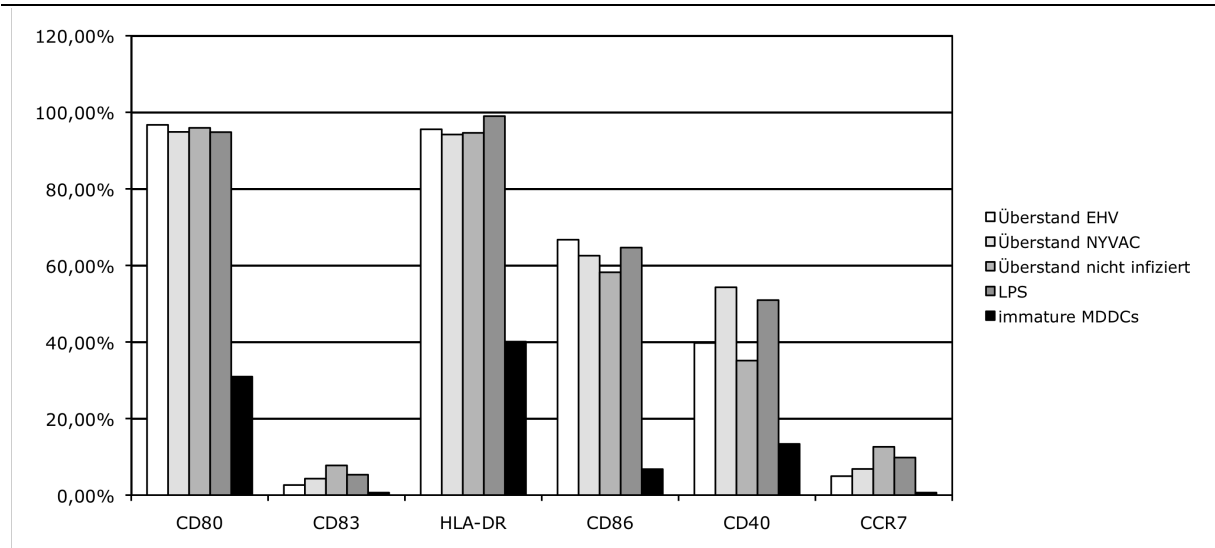


Abbildung 3.1

Oberflächenmarkerexpression von MDDCs, die durch den Überstand vorher infizierter MRC-5-Zellen stimuliert wurden

Die MDDCs wurden mit Überstand EHV-C oder NYVAC-C infizierter MRC-5-Zellen, nicht infizierter MRC-5-Zellen oder direkt mit LPS für 24 Stunden inkubiert. Dabei zeigt sich bei nahezu allen Oberflächenmarkern eine ähnlich hohe Expression.

3.1.2 Vergleich zwischen der Verwendung von Fetalem Kälberserum (FKS) und humanem AB-Serum im Medium der MRC-5-Zellen in Bezug auf die Oberflächenmarkerexpression von MDDCs

In diesem Versuch wurde die Oberflächenmarkerexpression von MDDCs nach Maturation durch den Überstand infizierter MRC-5 Zellen in jeweils unterschiedlichen Zellkulturmedien untersucht. Dies unter der Vorstellung, dass FKS-Medium die dendritischen Zellen schon per se stimuliert. Im vorangegangenen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenmarkerexpression von MDDCs nach Stimulation nicht infizierter MRC-5 Zellen genau so hoch war wie durch infizierte MRC-5 Zellen. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um ein Effekt des verwendeten Zellkulturmediums handelte, wurde die Oberflächenmarkerexpression von MDDCs durch den Überstand infizierter MRC-5 Zellen diesmal in zwei unterschiedlichen Zellkulturmedien untersucht.

Die immaturnen MDDCs zeigten mit FKS-Medium kultiviert für CD80 einen Wert von 23,32%, für CD83 0,7%, für HLA-DR 98,14%, für CD86 34,12%, für CD40 11,49% und für CCR7 1,42%. Dagegen zeigten sich bei den immaturnen MDDCs mit ABS-Medium kultiviert deutlich geringere Werte mit Werten für CD80 von 2,71%, für CD83 von 0,6%, für HLA-DR von 89,83%, für CD86 von 41,55%, für CD40 von 3,07% und für CCR7 von 0,8%.

Eine Maturation durch den Überstand EHV-infizierter MRC-5 Zellen ergab unter Verwendung von FKS-Medium eine Hochregulierung für CD80 von 97,13% und unter der Verwendung von ABS-Medium von 40,14%. CD83 wurde mit FKS-Medium auf 30,04% hochreguliert, mit ABS-Medium auf 6,14%. HLA-DR mit FKS-Medium wurde auf 98,28%, mit ABS-Medium auf 99,55% hochreguliert. CD86 zeigte mit FKS-Medium eine Expression von 91,26%, mit ABS-Medium von 97,28%. CD40 mit FKS-Medium wurde auf 45,73%, mit ABS-Medium auf 5,55% hochreguliert. CCR7 zeigte mit FKS-Medium kultiviert eine Expression von 11,01%, mit ABS-Medium eine Expression von 1,21%.

Eine Maturation durch den Überstand NYVAC-infizierter MRC-5 Zellen zeigte unter Verwendung von FKS-Medium eine Hochregulierung für CD80 von 97,17% und unter der Verwendung von ABS-Medium 40,71%. CD83 wurde mit FKS-Medium auf 43,39% hochreguliert, mit ABS-Medium auf 8,11%. HLA-DR zeigte unter Verwendung von FKS-Medium eine Expression von 97,68% und unter Verwendung von ABS-Medium 99,31%. Der Oberflächenmarker CD86 wurde mit FKS-Medium auf 90,58% hochreguliert, mit ABS-Medium auf 97,84%. Die Expression von CD40 mit FKS-Medium betrug 42,17%, mit ABS-

Medium 5,45%. CCR7 wurde mit FKS-Medium auf 10,49% hochreguliert, mit ABS-Medium auf 2,27%.

Der Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen bewirkte unter der Verwendung mit FKS-Medium eine Expression von CD80 von 98,44%, unter der Verwendung mit ABS-Medium eine Expression von 35,83%. CD83 wurde mit FKS-Medium auf 54,76%, mit ABS-Medium auf 7,03% hochreguliert. HLA-DR zeigte mit FKS-Medium eine Expression von 95,67%, mit ABS-Medium von 99,75%. CD86 wurde unter der Verwendung mit FKS-Medium auf 87,9%, unter der Verwendung von ABS-Medium auf 90,9% hochreguliert. Mit FKS-Medium betrug die Expression bei dem Oberflächenmarker CD40 48,61%, mit ABS-Medium 4,03%. CCR7 wurde mit FKS-Medium auf 12,18% hochreguliert, mit ABS-Medium 1,26%.

Die Stimulation mit LPS als Positivkontrolle betrug unter Verwendung von FKS-Medium für CD80 98,54%, für CD83 55,53%, für HLA-DR 99,65%, für CD86 91,06%, für CD40 42,53% und für CCR7 8,23%. Unter der Verwendung von ABS-Medium ergab die Stimulation mit LPS für CD80 40,69%, für CD83 9,77%, für HLA-DR 99,15%, für CD86 90,9%, für CD40 4,12% und für CCR7 1,86%.

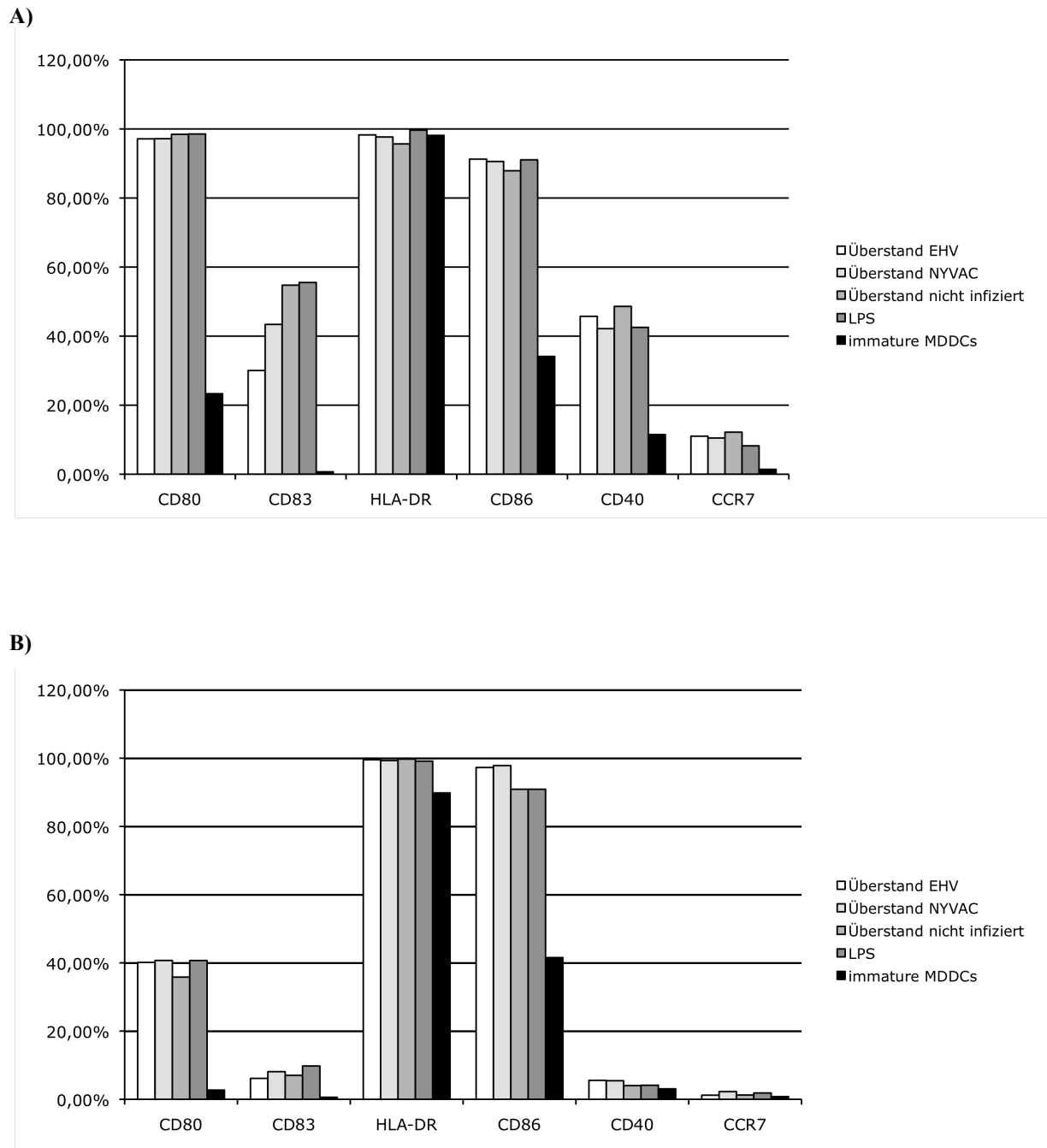


Abbildung 3.2

Oberflächenmarkerexpression von MDDCs, die vorher durch den Überstand virusinfizierter MRC-5-Zellen 24 Stunden stimuliert wurden

Unabhängig von der Verwendung von FKS (A) oder ABS (B) im Medium stimuliert der Überstand nicht infizierter MRC-5-Zellen die MDDCs in gleicher Weise wie der Überstand EHV oder NYVAC infizierter MRC-5-Zellen oder LPS direkt.

Insgesamt werden die Oberflächenmarker beim Einsatz von ABS-Medium weniger hochreguliert als beim Gebrauch von FKS-Medium, insbesondere deutlich sichtbar bei CD80, CD83, CD40 und CCR7.

Auch der jeweilige Oberflächenmarker Ausgangswert immaturer MDDCs liegt bei der Verwendung mit ABS-Medium niedriger als bei der Verwendung mit FKS-Medium.

3.1.3 Vergleich der CD80-Oberflächenmarkerexpression von MDDCs durch Stimulation mit reinem Medium und Medium, das vorher in Kontakt mit MRC—Zellen war

Um zu untersuchen, ob MDDCs durch den Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen stimuliert werden, wurde eine zusätzliche Kontrolle in den Versuchsaufbau zugefügt: MDDCs stimuliert nur mit ABS-Medium. In fünf Tagen reiften die CD14⁺ Monozyten zu immaturren MDDCs. Der Überstand der infizierten MRC-5 Zellen stimulierte die iMDDCs für 24 Stunden.

Nach der Stimulation mit den Überständen zeigte sich bei den MDDCs eine deutliche Expression von CD80 durch den Überstand von EHV infizierter MRC-5 Zellen (31%), durch den Überstand NYVAC infizierter MRC-5 Zellen (33%) und durch den Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen (35%). Wurden die MDDCs nur durch ABS-Medium, das keinen Kontakt zu MRC-5 Zellen hatte, stimuliert, zeigte sich lediglich eine CD80 Expression von 12%. Immature MDDCs vor der Stimulation wiesen eine CD80 Expression von 4% auf (vgl. Abbildung 3.3). Die Stimulation mit LPS als Positivkontrolle ergab eine CD80 Expression von 84%.

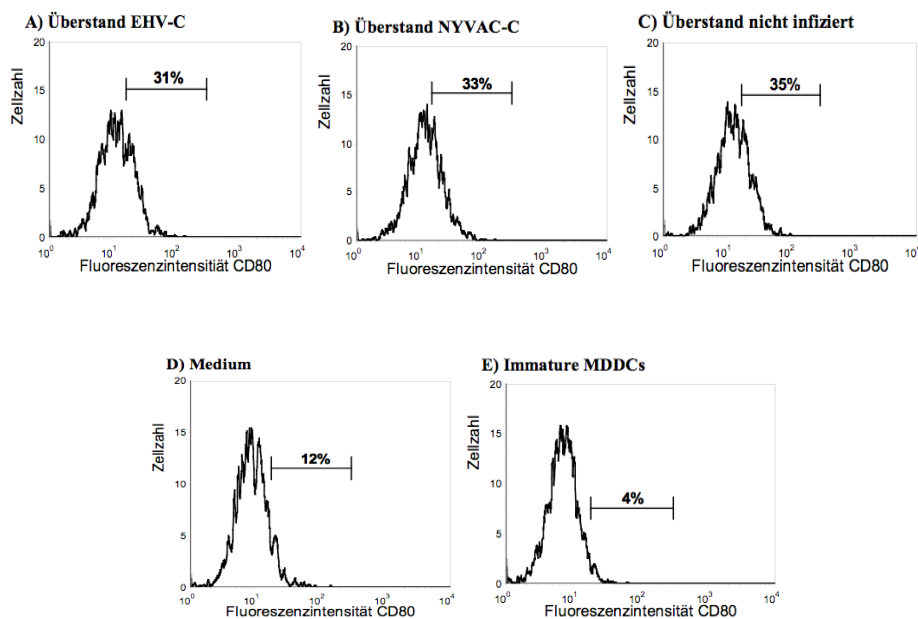


Abbildung 3.3

CD80 Oberflächenmarkerexpression auf MDDCs nach Stimulation mit infizierten MRC-5-Zellen

Die Stimulation der MDDCs mit Überstand aus EHV, NYVAC oder nicht infizierter MRC-5-Zellen erfolgte jeweils für 24 Stunden bei ausschließlicher Verwendung von ABS-Medium. Die Inkubation mit Medium (D), das nicht in Kontakt mit MRC-5-Zellen war, resultiert in einer wesentlich geringeren Hochregulierung von CD80 als die Proben, die mit MRC-5-Zellen in Kontakt waren (A,B,C).

3.2 Analyse der Oberflächenmarkerexpression von MDDCs, die vorher durch den Überstand virusinfizierter autologer PBMCs oder CD14⁺ stimuliert wurden

Da in den vorangegangenen Versuchen das *Cross Priming* durch infizierte MRC-5 Zellen nicht durchgeführt werden konnte, wurde ein autologes System entworfen. Dabei wurden PBMCs oder CD14⁺ Zellen mit EHV oder NYVAC infiziert. Die daraus entstandenen Überstände wurden dazu verwendet iMDDCs, generiert vom gleichen Spender wie die infizierten PBMCs, für 48 Stunden zu stimulieren. Insgesamt werden die iMDDCs durch den Überstand EHV infizierter PBMCs oder CD14⁺ Zellen deutlich maturiert, während der Überstand NYVAC infizierter PBMCs die Oberflächenmarker auf MDDCs nicht hochreguliert. Außerdem werden die iMDDCs durch den Überstand nicht infizierter autologer Zellen (PBMCs oder CD14⁺ Zellen) nicht stimuliert. (vgl. Abbildung 3.4)

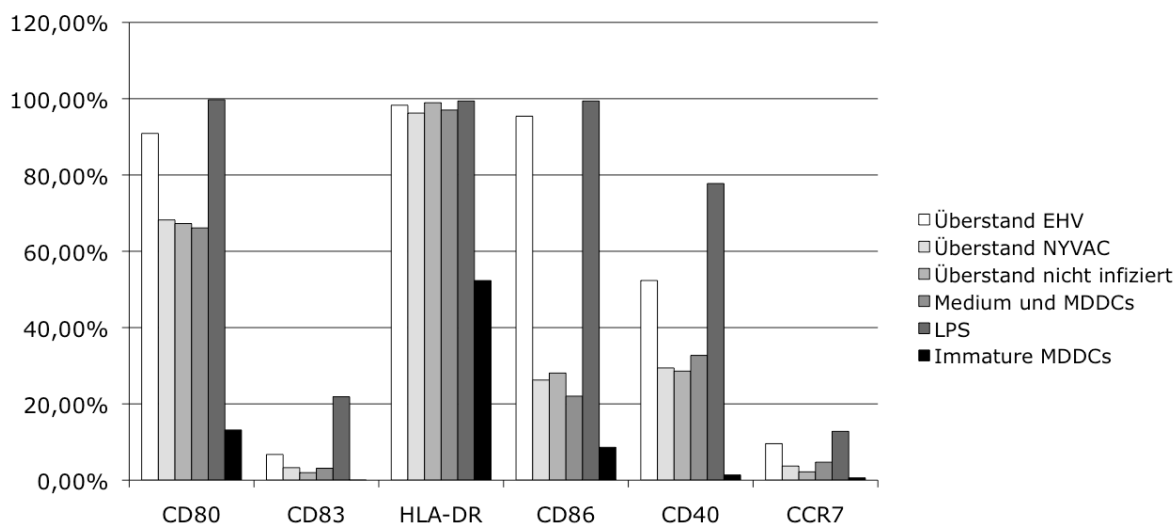
Der Oberflächenmarker CD80 wurde durch den Überstand EHV infizierter PBMCs auf 90,9%, CD83 auf 6,74%, CD 86 auf 95,41%, HLA-DR auf 98,29%, CD40 auf 52,34% und CCR7 auf 9,56% hochreguliert. Im Vergleich dazu erreichte die Stimulation mit dem Überstand NYVAC infizierter PBMCs und nicht infizierterter PBMCs ähnliche Oberflächenmarkerexpressionen wie die Stimulation der iMDDCs mit Medium alleine. Für CD80 konnte für NYVAC 68,21%, für nicht infizierte PBMCs 67,26% und für Medium alleine 66,13% gemessen werden. CD83 zeigte durch NYVAC auf den MDDCs eine Expression von 3,28%, durch nicht infizierte PBMCs von 1,97% und durch Medium alleine von 3,12%. Für CD86 konnte für NYVAC 26,24%, für nicht infizierte PBMCs 28,08% und für Medium alleine 22,02% gemessen werden. Der Oberflächenmarker HLA-DR wurde durch NYVAC auf 96,24% hochreguliert, durch nicht infizierte PBMCs auf 98,94% und durch Medium alleine auf 97,03%. CD40 erreichte durch NYVAC eine Expression von 29,42%, durch nicht infizierte PBMCs von 28,59% und durch Medium alleine 32,71%. Für CCR7 konnte durch NYVAC ein Wert von 3,7%, durch nicht infizierte PBMCs von 2,18% und durch Medium alleine ein Wert von 4,71% gemessen werden. Nach Stimulation der MDDCs mit LPS als Positivkontrolle erreichte CD80 eine Expression von 99,7%, CD83 von 21,86%, CD 86 von 99,4%, HLA-DR von 99,95%, CD40 von 77,77% und CCR7 von 12,79%.

Alternativ wurden für die autologen Stimulationsversuche auch CD14⁺ Zellen mit EHV oder NYVAC infiziert und deren Überstände dazu verwendet iMDDCs zu stimulieren. Insgesamt zeigt sich genau wie bei infizierten PBMCs eine deutliche Stimulation der iMDDCs durch EHV, dabei aber tendenziell weniger. Der Oberflächenmarker CD80 wird durch den Überstand EHV infizierter CD14⁺ Zellen auf 81,81% hochreguliert, CD83 auf 3,89%, CD86

auf 56,18%, HLA-DR auf 99,39%, CD40 auf 34,97% und CCR7 auf 3,19%. Der Überstand NYVAC infizierter CD14⁺ Zellen zeigte bei CD80 eine Expression von 62,9%, nicht infizierte CD14⁺ Zellen von 67,02% und Medium alleine 69,37%. Für den Oberflächenmarker CD83 konnte nach Stimulation für NYVAC eine Expression von 2,73%, für nicht infizierte CD14⁺ Zellen von 1,72% und für Medium alleine 2,83% gemessen werden. CD86 wurde durch den Überstand NYVAC infizierter CD14⁺ Zellen auf 26,35% hochreguliert, durch nicht infizierte CD14⁺ Zellen auf 26,71% und durch Medium alleine auf 31,03%. Bei HLA-DR zeigte sich durch NYVAC eine Expression von 95,46%, durch nicht infizierte CD14⁺ Zellen von 96,98% und durch Medium alleine 99,39%. Der Oberflächenmarker CD40 wurde durch NYVAC auf 30,35% hochreguliert, durch nicht infizierte CD14⁺ Zellen auf 30,49% und durch Medium alleine 36,03%. CCR7 zeigte durch NYVAC eine Expression von 3,89%, durch nicht infizierte CD14⁺ Zellen von 4,45% und durch Medium alleine von 2,17%. Nach Stimulation mit LPS als Positivkontrolle zeigte sich bei CD80 ein Wert von 99,75%, bei CD83 von 22,02%, bei CD86 von 99,75%, bei HLA-DR von 99,95%, bei CD40 von 78,09% und bei CCR7 von 13,26%.

Vor Stimulation wiesen die iMDDCs auf ihrer Oberfläche CD80 zu 13,15% auf, CD83 zu 0,05%, CD86 zu 8,61%, HLA-DR zu 52,33%, CD40 zu 1,36% und zu CCR7 0,6%.

A)



B)

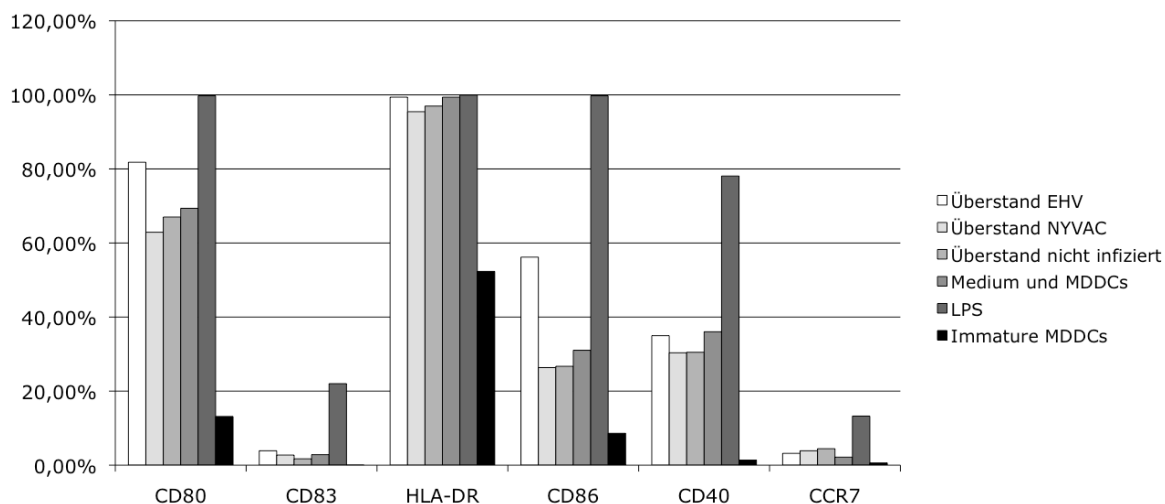


Abbildung 3.4

Oberflächenmarkerexpression von MDDCs, die durch den Überstand infizierter autologer PBMCs oder CD14⁺ Zellen stimuliert wurden

Bei der Verwendung von Überstand aus infizierten PBMCs (A) oder CD14⁺ Zellen (B), die vom gleichen Spender stammen wie die dann stimulierten MDDCs, werden nahezu alle Oberflächenmarker der MDDCs durch den Überstand EHV infizierter Zellen deutlich hochreguliert.

Beim Einsatz von Überstand nicht infizierter Zellen ist die Oberflächenmarkerexpression der MDDCs ähnlich niedrig wie nach der Inkubation mit reinem Medium.

Generell lassen sich die MDDCs mit autologen PBMCs (A) besser stimulieren als mit autologen CD14⁺ Zellen.

3.3 Vergleich der beiden *in vitro* Modelle zur Bestimmung des *Cross Priming* Potentials: Inkubation in Transwells oder Verwendung des Überstands virusinfizierter Zellen

Das *Cross Priming* Potential der Vakzinekandidaten EHV und NYVAC wurde in zwei verschiedenen *in vitro* Modellen bestimmt. Zum einen wurden die Überstände der infizierten Zellen dazu verwendet, die iMDDCs zu stimulieren. Zum anderen wurden die MDDCs mittels Transwells mit den infizierten Zellen in Co-Kultur gebracht. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der Stimulationsversuche mit dem Überstand infizierter Zellen (graphisch in Abbildung 3.4 dargestellt). In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Transwellversuche zusammengefasst. Um darzustellen, dass die Ergebnisse der zwei verschiedenen Versuche kaum differieren, wurde aus beiden Ansätzen der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Dabei befindet sich die Standardabweichung größtenteils unter 1% und insgesamt höchstens unter 7,56%. (vgl. Tabelle 5, Tabelle 6, Abbildung 3.5).

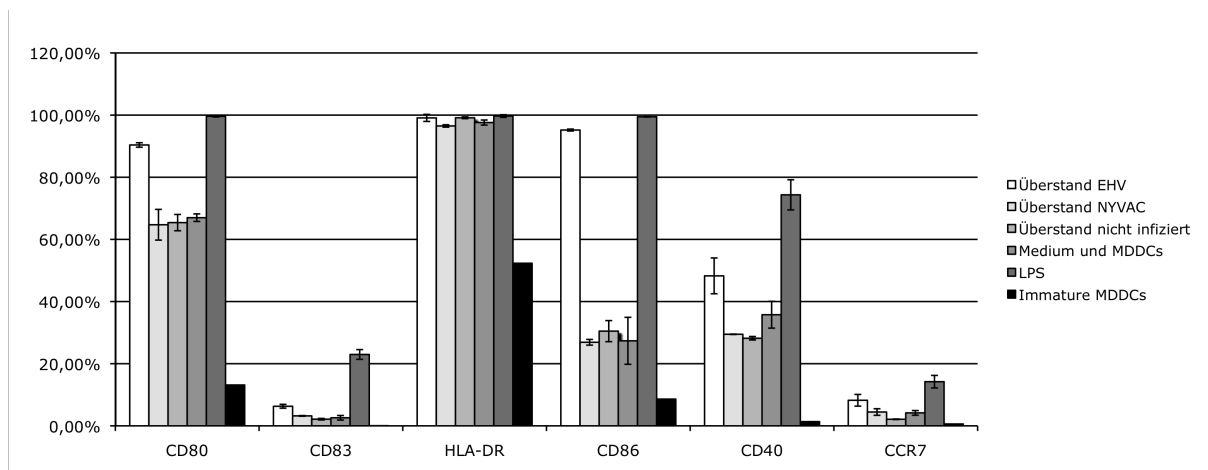


Abbildung 3.5

Mittelwerte und Standardabweichung der Stimulationsversuche mit „Tranwells“ und mit „Überstand infizierter PBMCs“

MDDCs wurden entweder mit virusinfizierten PBMCs in Transwells inkubiert, oder mit dem Überstand virusinfizierter PBMCs stimuliert, unter sonst identischen Bedingungen.

Die Mittelwerte, die sich aus den beiden verschiedenen Versuchen ergeben, sind mit den Ergebnissen aus 3.4A (MDDCs stimuliert mit Überstand virusinfizierter PBMCs) vergleichbar; die Standardabweichung, die unter Einberechnung des Transwellversuchs entsteht, ist eingezeichnet und beträgt höchstens 7,56%.

Beide Versuchsarten liefern gleiche Ergebnisse hinsichtlich des Maturierungsverhalten der MDDCs.

Tabelle 3: Stimulation mit Überstand virusinfizierter PBMCs

	CD80	CD83	HLA-DR	CD86	CD40	CCR7
Überstand EHV	90,90%	6,74%	98,29%	95,41%	52,34%	9,56%
Überstand NYVAC	68,21%	3,28%	96,24%	26,24%	29,42%	3,70%
Überstand nicht infiziert	67,26%	1,97%	98,94%	28,08%	28,59%	2,18%
Medium und MDDCs	66,13%	3,12%	97,03%	22,02%	32,71%	4,71%
LPS	99,75%	21,86%	99,40%	99,40%	77,77%	12,79%
Immature MDDCs	13,15%	0,05%	52,33%	8,61%	1,36%	0,60%

Tabelle 4: Stimulation durch Co-Kultur von virusinfizierter PBMCs und MDDCs mittels Transwells

	CD80	CD83	HLA-DR	CD86	CD40	CCR7
EHV	89,88%	5,86%	99,90%	94,97%	44,19%	6,89%
NYVAC	61,22%	3,13%	96,78%	27,54%	29,52%	5,20%
nicht infiziert	63,55%	2,32%	99,34%	32,88%	27,79%	2,05%
Medium	67,85%	2,08%	98,18%	32,71%	38,81%	3,64%
LPS	99,44%	24,08%	100,00%	99,49%	70,91%	15,64%
Immature MDDCs	13,15%	0,05%	52,33%	8,61%	1,36%	0,60%

Tabelle 5: Mittelwerte aus „Stimulation mit Überstand virusinfizierter Zellen“ und „Transwellversuch“

	CD80	CD83	HLA-DR	CD86	CD40	CCR7
EHV	90,39%	6,30%	99,10%	95,19%	48,27%	8,23%
NYVAC	64,72%	3,21%	96,51%	26,89%	29,47%	4,45%
nicht infiziert	65,41%	2,15%	99,14%	30,48%	28,19%	2,12%
Medium	66,99%	2,60%	97,61%	27,37%	35,76%	4,18%
LPS	99,60%	22,97%	99,70%	99,45%	74,34%	14,22%

Tabelle 6: Standardabweichung aus „Stimulation mit Überstand virusinfizierter Zellen“ und „Transwellversuch“

	CD80	CD83	HLA-DR	CD86	CD40	CCR7
EHV	0,72%	0,62%	1,14%	0,31%	5,76%	1,89%
NYVAC	4,94%	0,11%	0,38%	0,92%	0,07%	1,06%
nicht infiziert	2,62%	0,25%	0,28%	3,39%	0,57%	0,09%
Medium	1,22%	0,74%	0,81%	7,56%	4,31%	0,76%
LPS	0,22%	1,57%	0,42%	0,06%	4,85%	2,02%

3.4 Intrazellulärer GagPolNef Nachweis mittels p24-FACS-Analyse von EHV-C und NYVAC-C infizierten PBMCs

Um nachzuweisen, dass PBMCs erfolgreich mit EHV oder NYVAC infiziert werden können, wurde nach Infektion mit einer MOI 10 eine intrazelluläre p24 FACS-Analyse durchgeführt. In den PBMCs, die mit EHV infiziert wurden, konnte p24 einmal mit 27,74% und einmal mit 23,42% nachgewiesen werden. Nach Infektion mit NYVAC zeigte sich p24 lediglich mit 1,94% und ein zweites Mal mit 1% in den PBMCs. Die Mittelwerte aus beiden Versuchen sind in Abbildung 3.6 mit eingezeichneter Standardabweichung gezeigt. Die Negativkontrolle, eine p24 FACS-Analyse aus nicht infizierten PBMCs ergab 0%.

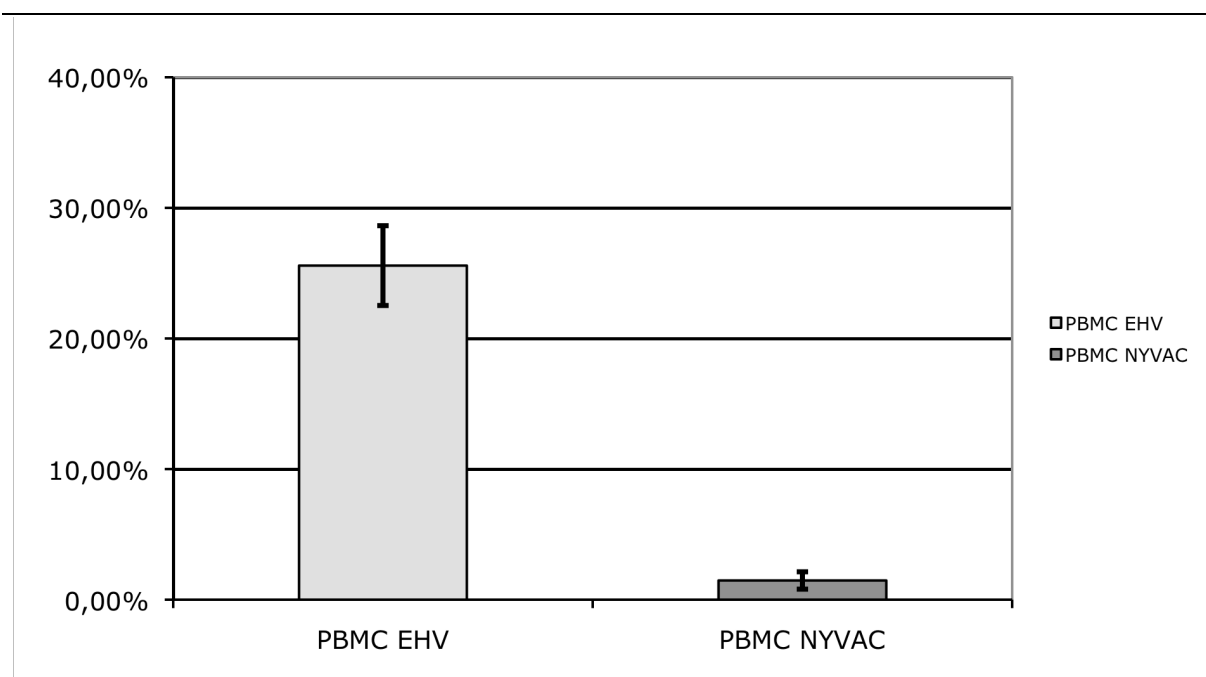


Abbildung 3.6

Intrazelluläre GagPolNef-Expression in PBMCs

Nach Infektion der PBMCs mit EHV-C oder NYVAC-C wurde nach 12 Stunden Inkubation die GagPolNef-Expression mittels p24-FACS-Analyse bestimmt. Eine Inkubation mit Medium ergab den Wert Null.

Die GagPolNef-Expression in PBMCs ist nach Infektion mit EHV-C deutlich höher als nach Infektion mit NYVAC-C.

3.5 Generierung von Fibrozyten aus PBMCs oder CD14⁺ Zellen

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das *Cross Priming* Potential von MDDCs über eine erfolgreiche Maturation durch Stimulation mit dem Überstand infizierter autologer PBMCs mittels FACS-Analyse bestimmt werden kann. Weiter sollten nun als zu infizierende Zellen Fibrozyten verwendet werden, dies aber trotzdem in einem autologen Versuchsansatz. Gestützt auf Versuche von Chesney et. al. und Abe et. al. sollten Fibrozyten aus PBMCs oder CD14⁺ Zellen generiert werden, um einem möglichen Weg des Impfstoffs zur Immunantwort *in vitro* näher zu kommen. Jedoch waren die Versuchsprotokolle in den Veröffentlichungen der Autoren für eine identische Fibrozytengenerierung nur unzureichend. So musste durch mehrere Versuche die Auswahl geeigneter Kulturflaschen beziehungsweise allgemein geeigneter Kulturböden bestimmt werden, aber auch das Zellkulturmedium und die Anzahl ausgesäter Zellen pro cm² stellten wichtige unabhängige Variable dar. Außerdem musste untersucht werden, in wie vielen Tagen PBMCs oder CD14⁺ Zellen zu Fibrozyten reifen und ob in dieser Zeit das Medium gewechselt werden muss oder nicht. Die aus CD14⁺ generierten Fibrozyten wurden zunächst ihrer mikroskopischen Morphologie hin beurteilt und schließlich auf ihren Collagen-I-Gehalt hin mittels FACS-Analyse charakterisiert

3.5.1 Generierung von Fibrozyten mit verschiedenen Medien (Ultra Culture, DMEM + 20% FKS) und Vergleich zwischen normalen Kulturflaschen und Fibronektin-gecoateten Kulturflaschen

PBMCs wurden nach Protokoll (vgl. 2.2.1) isoliert. In eine Fibronektin-gecoatete Zellkulturflasche oder eine nicht Fibronektin-gecoatete Zellkulturflasche mit 25 cm² Bodenfläche wurden $1,5 \cdot 10^7$ Zellen (600.000 Zellen/cm²) in insgesamt 10 ml UltraCulture Medium oder DMEM20% gegeben. CD14⁺ Zellen wurden nach selbigem Schema auf die verschiedenen Zellkulturflaschen mit verschiedenem Zellkulturmedium verteilt, allerdings wurden hier $7 \cdot 10^6$ Zellen pro 25 cm² Flasche (280.000/cm²) eingesetzt. Wenn das Zellkulturmedium gelblich wurde, wurde das jeweilige Medium gewechselt, im Durchschnitt alle 2-3 Tage. Nach 8 Tagen bildeten sich am deutlichsten in dem Ansatz „CD14⁺ Zellen, normale T25 Zellkulturflasche, DMEM20%“ spindelförmige Zellen aus (Abb. 3.7 A). Bis auf den Ansatz „PBMCs, normale T25 Zellkulturflasche, DMEM20%“ starben die Zellen in

jedem weiteren Ansatz bis zum 8. Tag ab (als Beispiel Abb. 3.7 C). Nach 11 Tagen waren auch bei den PBMCs spindelförmige Zellen zu erkennen (Abb. 3.7 B).

Zusammengefasst konnten folgende Erkenntnisse aus dem Versuch gewonnen werden: Ultra Culture Medium und Fibronectin gecoatete Zellkulturflaschen eignen sich nicht zur Fibrozytengenerierung. Zur Fibrozytengenerierung sollten normale Plastikzellkulturflaschen und als Zellkulturmedium DMEM20% verwendet werden.

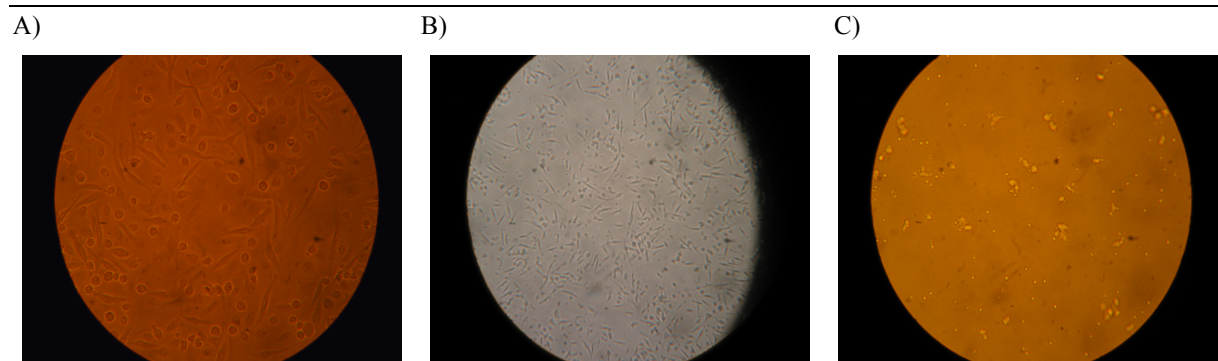


Abbildung 3.7

Nach Isolation von PBMCs bzw. $CD14^{+}$ Zellen wurde die Zellentwicklung unter unterschiedlichen Bedingungen beobachtet. $7 \cdot 10^6$ $CD14^{+}$ Zellen (A) wurden in einer normalen T25-Flasche mit DMEM 20% inkubiert. Nach 8 Tagen bildeten sich deutlich spindelförmige fibrozytenähnliche Zellen aus (A).

$1,5 \cdot 10^7$ PBMCs (B) wurden ebenfalls in einer normalen T25 mit DMEM 20 % FKS inkubiert. Nach 11 Tagen waren auch hier (B) spindelförmige fibrozytenähnliche Zellen erkennbar.

In allen anderen Ansätzen mit Ultra Culture Medium oder Fibronectin-gecoateten Flaschen bildeten sich keine spindelförmigen Zellen aus (als Beispiel dazu C).

3.5.2 Vergleich der Fibrozytengenerierung aus PBMCs und aus $CD14^{+}$ Zellen durch den Einsatz jeweils unterschiedlicher Anzahl pro cm^2

In einem weiteren Ansatz wurden entweder PBMCs oder $CD14^{+}$ Zellen mit DMEM20% in verschiedener Anzahl pro cm^2 in entweder einer Zellkulturflasche mit 25 cm^2 Bodenfläche, in einer 12-Well-Platte oder in einer 24-Well-Platte für insgesamt 14 Tage inkubiert. In die Zellkulturflasche mit 25 cm^2 Bodenfläche wurden $3 \cdot 10^7$ PBMCs ($1,2 \cdot 10^6$ Zellen/ cm^2) und $1 \cdot 10^7$ $CD14^{+}$ Zellen (400.000 Zellen/ cm^2). In die 12-Well-Platte wurden $2,6 \cdot 10^6$ PBMCs pro Napf (≈ 680.000 Zellen/ cm^2) und $1,5 \cdot 10^6$ $CD14^{+}$ Zellen pro Napf (≈ 390.000 Zellen/ cm^2) gegeben. In die 24-Well-Platte wurden $1,5 \cdot 10^6$ PBMCs pro Napf (≈ 660.000 Zellen/ cm^2) und $1 \cdot 10^6$ $CD14^{+}$ Zellen pro Napf (≈ 440.000 Zellen/ cm^2) gegeben.

Nach 14 Tagen entwickelten sich die $CD14^{+}$ Zellen in der 24-Well-Platte am besten zu spindelförmigen Zellen (vgl. Abb. 3.8 A und B). Generell veränderten sich alle Ansätzen mit

CD14⁺ Zellen eher zu morphologisch fibrozytenähnlichen Zellen als die Ansätze mit PBMCs. Dabei entwickelten sich die Fibrozyten besser, wenn weniger Zellen/cm² ausgesät wurden. In einem weiteren Versuch bei dem unterschiedlich hohe Zellanzahlen CD14⁺ Zellen ausgesät wurden entwickelten sich die CD14⁺ Zellen am besten mit 500.000 Zellen pro Napf in einer 24-Well-Platte (≈ 220.000 Zellen/cm²), (vgl. 3.8 C). Dabei wurde hier während der gesamten Inkubation für 14 Tage kein Mediumwechsel vorgenommen. In allen Ansätzen, in denen ein Mediumwechsel erfolgt war bildeten sich die Fibrozyten nicht so gut oder überhaupt nicht aus.

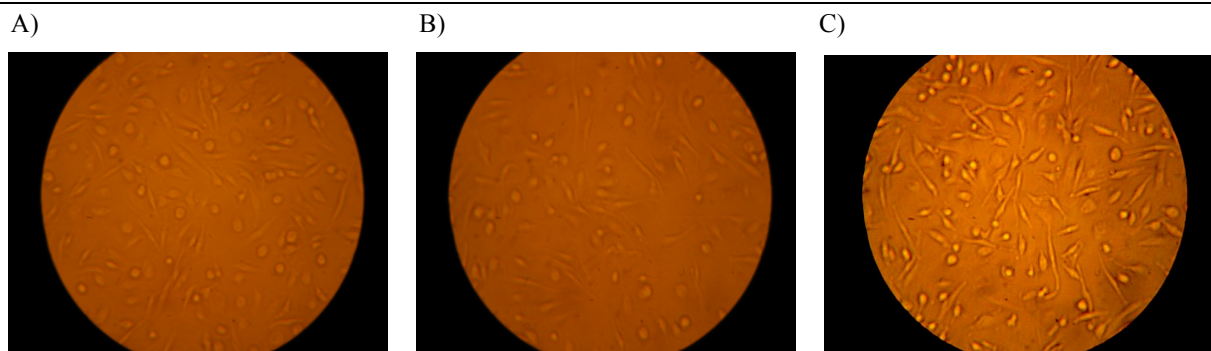


Abbildung 3.8

Sowohl in A) als auch in B) wurden in ein well einer 24-well-Platte $1 \cdot 10^6$ CD14⁺ Zellen ausgesät. Die Fotos wurden nach 15 Tagen erstellt und zeigen deutlich spindelförmige fibrozytenähnliche Zellen. In den Ansätzen, in denen mehr als $1 \cdot 10^6$ CD14⁺ Zellen ausgesät wurden, konnten keine vergleichbar guten Ergebnisse gefunden werden.

In C) wurden 500.000 CD14⁺ Zellen ausgesät und in DMEM20% ohne Mediumwechsel für 14 Tage inkubiert. Dieses Protokoll wurde für die weiteren Versuche mit autologen Fibrozyten verwendet.

3.5.3 Indirekte Collagen-I-Färbung und FACS-Analyse gewonnener Fibrozyten

Die in Vorversuchen generierten Fibrozyten wurden nicht nur ihrer Morphologie entsprechend beurteilt, sondern auch hinsichtlich ihrer Produktion von Collagen-I. Hierzu wurde eine indirekte Collagen-I-Färbung der Fibrozyten durchgeführt und die Collagen-I-Produktion mittels FACS-Analyse bestimmt.

Die morphologisch spindelförmigen Fibrozyten konnten für Collagen-I zu 97,6% positiv gemessen werden.

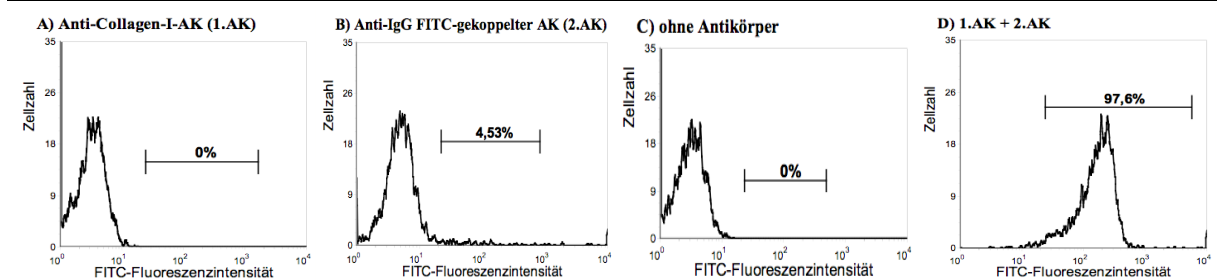


Abbildung 3.9

Indirekte Collagen-I-Färbung der autologen Fibrozyten

Mittels FACS-Analyse wurden die gewonnenen Fibrozyten durch eine indirekte Collagen-I-Färbung charakterisiert. Dabei zeigen sich 97,6% Collagen-I positive Zellen gegenüber der Kontrollen ohne Antikörper-Färbung oder mit jeweils nur einem Antikörper.

3.6 FACS-Analyse der Oberflächenmarkerexpression von MDDCs, die vorher durch den Überstand virusinfizierter autologer Fibrozyten stimuliert wurden

Die aus CD14⁺ generierten Fibrozyten wurden mit EHV oder NYVAC infiziert und deren Überstand wurde dazu verwendet MDDCs, die vom gleichen Spender generiert wurden, zu stimulieren.

Die Überstände EHV infizierter autologer Fibrozyten maturierten die iMDDCs deutlich gegenüber NYVAC infizierter autologer Fibrozyten. Um eine Stimulation durch das Fibrozytenmedium auszuschließen wurde als zusätzliche Negativkontrolle ein Ansatz mit MDDCs und Fibrozytenmedium (DMEM20%) hinzugefügt. Diese Negativkontrolle zeigt nur leicht mehr Maturation als die anderen Negativkontrollen.

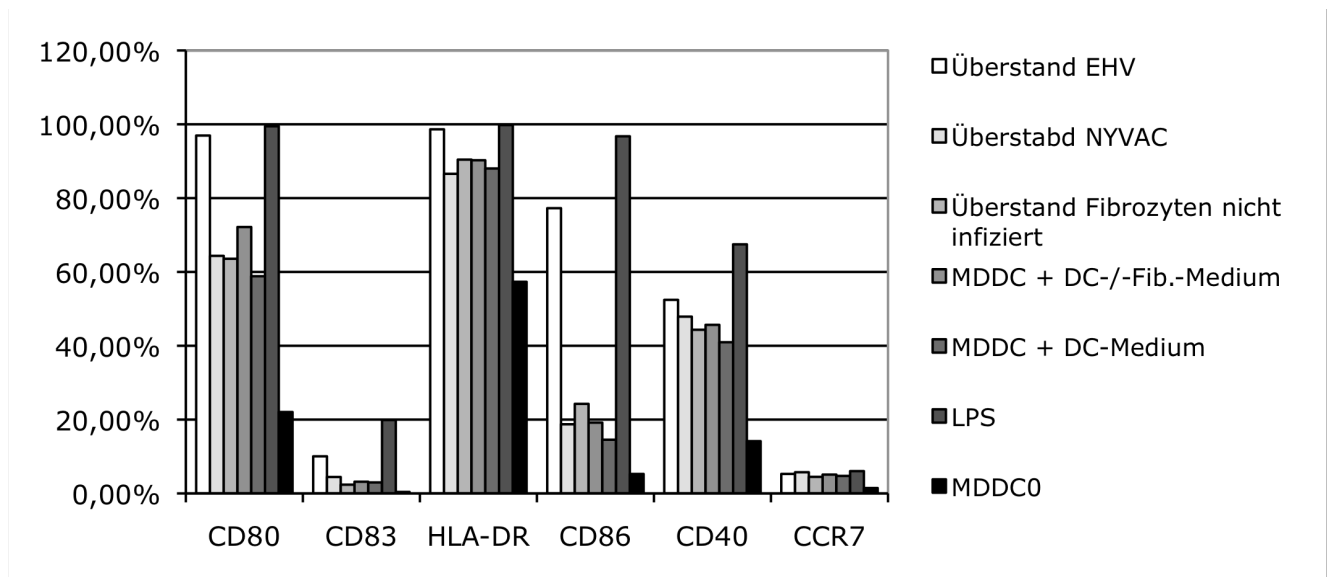
Der Überstand EHV infizierter autologer Fibrozyten bewirkt bei iMDDCs nach 24 Stunden Stimulation eine Hochregulierung von CD80 auf 96,95%, von CD 83 auf 10,05%, von HLA-DR auf 98,64%, von CD86 auf 77,27%, von CD40 auf 52,44% und von CCR7 auf 5,28%.

Auch nach 48 Stunden Stimulation werden durch EHV die iMDDCs deutlich stimuliert mit CD80 auf 99,2%, CD83 auf 11,35%, HLA-DR auf 98,56%, CD86 auf 82,95%, CD 40 auf 53,87% und CCR7 auf 12,14%. Im Gegensatz dazu wird der Oberflächenmarker CD80 von dem Überstand NYVAC infizierter autologer Fibrozyten nach 24 Stunden auf 64,36%, CD83 auf 4,45%, HLA-DR auf 86,58%, CD86 auf 18,73%, CD40 auf 52,44% und CCR7 auf 5,28% hochreguliert. Nach 48 Stunden wurde CD80 durch NYVAC auf 79,36%, CD83 auf 7,18%, HLA-DR auf 89,35%, CD86 auf 18,71%, CD40 auf 60,67% und CCR7 auf 13,33% hochreguliert. Die Negativkontrollen, Überstand nicht infizierter Fibrozyten, MDDCs mit Fibrozytenmedium oder DC-Medium, bewirkten eine ähnliche Hochregulierung wie NYVAC mit einer CD80 Expression nach 24 Stunden zwischen 58,84% - 72,17% und nach 48 Stunden zwischen 75% - 86,11%. Die CD83 Expression lag nach 24 Stunden zwischen 2,37% und 3,17%, nach 48 Stunden zwischen 3,35% - 5,66%. Die HLA-DR Expression wurde nach 24 Stunden zwischen 88,03% - 90,43%, nach 48 Stunden zwischen 83,27% - 95,99% gemessen. Die CD86 Expression lag nach 24 Stunden zwischen 14,55% - 24,26% und nach 48 Stunden zwischen 13,46% und 20,29%. Die CD40 Expression zeigte nach 24 Stunden Werte zwischen 40,96% - 45,67% und nach 48 Stunden zwischen 51,22% - 69,78%. CCR7 erreichte nach 24 Stunden Stimulation auf den MDDCs eine Expression zwischen 4,49% - 5,1% und nach 48 Stunden zwischen 5,77% - 14,08%.

Als Positivkontrolle bewirkte LPS bei CD80 nach 24 und 48 Stunden eine Stimulation von 99,46% und 98,88%, bei CD83 von 19,88% und 39,91%, bei HLA-DR von 99,79% und 98,7%, bei CD86 von 96,75% und 98,04%, bei CD40 67,48% und 77,64%, sowie bei CCR7 von 6,04% und 18,52%.

Immature MDDCs zeigten für CD80 eine Expression von 22,05%, für CD83 von 0,4%, für HLA-DR von 57,33%, für CD86 von 5,27%, für CD40 von 14,16% und für CCR7 von 1,46%.

A)



B)

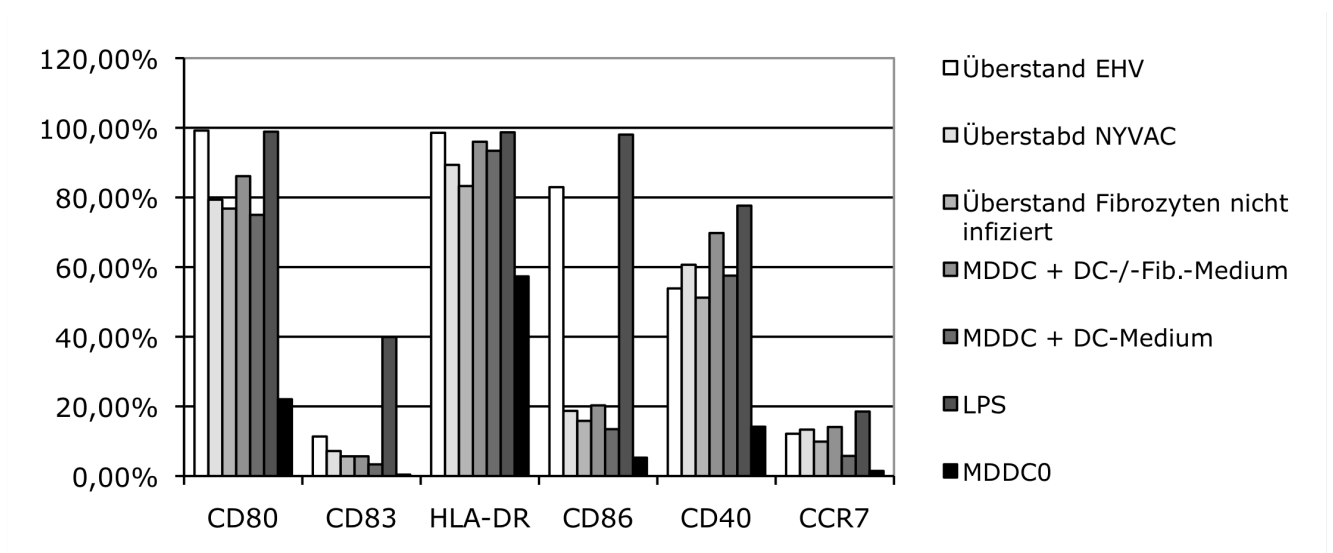


Abbildung 3.10

Oberflächenmarkerexpression von MDDCs, die durch den Überstand vorher infizierter autologer Fibrozyten 24 (A) und 48 (B) Stunden stimuliert wurden.

Zunächst wurden aus CD14⁺ Zellen Fibrozyten generiert und mit EHV-C oder NYVAC-C infiziert. Nach 12 Stunden Inkubation wurde der Überstand dazu verwendet, MDDCs vom gleichen Spender für 24 (A) und für 48 (B) Stunden zu stimulieren.

Da im gesamten Versuch mit zwei verschiedenen Zellkulturmedien gearbeitet wurde, diente zum einen DC- und Fibrozyten-Medium, zum anderen nur DC-Medium als Kontrolle.

Nahezu alle Oberflächenmarker werden nach Stimulation mit dem Überstand EHV-C infizierter autologer Fibrozyten deutlich hochreguliert. Die Oberflächenmarkerexpression NYVAC-C infizierter autologer Fibrozyten gleicht der nicht infizierten Kontrolle.

Insgesamt werden die MDDCs in der Kontrolle DC-/Fib.-Medium, das prozentual mehr FKS enthält, leicht mehr stimuliert als die MDDCs in der Kontrolle mit DC-Medium allein.

3.7 Zytokingehalt nach Stimulation der MDDCs mit Überstand virusinfizierter Zellen (oder mittels Co-Kultur mit virusinfizierter Zellen im Transwell)

Nachdem die iMDDCs mit dem Überstand infizierter PBMCs stimuliert wurden, wurde zum Einen die Oberflächenmarkerexpression mittels FACS-Analyse bestimmt (vgl. 3.2). Zum Anderen wurde der verbleibende Mediumüberstand mittels ELISA auf den Zytokingehalt an IL-6, IL-10, IL-12 und TNF-alpha untersucht. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte zweier unabhängig voneinander durchgeführter Versuche mit verschiedenen Spendern.

Der Zytokingehalt nach Stimulation mit EHV infiziertem Überstand ist tendenziell höher als nach Stimulation mit NYVAC infiziertem Überstand oder nicht infiziertem Überstand, bei insgesamt im Vergleich zur Positivkontrolle LPS sehr niedrigen Absolutwerten. EHV bewirkt im Überstand der MDDCs nach Stimulation einen IL-6 Gehalt von 410,79 pg/ml, einen IL-10 Gehalt von 37,58 pg/ml, einen IL-12 Gehalt von 100,53 pg/ml und einen TNF-alpha Gehalt von 71,11 pg/ml. Dagegen konnte nach der Stimulation mit dem Überstand NYVAC infizierter PBMCs nur ein IL-6 Gehalt von 24,68 pg/ml, ein IL-10 Gehalt von 24,86 pg/ml, einen IL-12 Gehalt von 24,49 pg/ml und einen TNF-alpha Gehalt von 0 pg/ml. Der Überstand nicht infizierter PBMCs enthielt 42,82 pg/ml IL-6, 51,88 pg/ml IL-10, 14,78 pg/ml IL-12 und 3,9 pg/ml TNF-alpha. Die Negativkontrolle, nur Medium alleine, zeigte einen IL-6 Gehalt von 5,52 pg/ml, einen IL-10 Gehalt von 20,49 pg/ml, einen IL-12 Gehalt von 1,85 pg/ml und einen TNF-alpha Gehalt von 2,43 pg/ml. Wurden die MDDCs mit LPS stimuliert, wurde nach 24 Stunden Stimulation ein IL-6 Gehalt von 2830,33 pg/ml gemessen, ein IL-10 Gehalt von 996,9 pg/ml, ein IL-12 Gehalt von 1634,59 pg/ml und ein TNF-alpha Gehalt von 4406 μ g/ml.

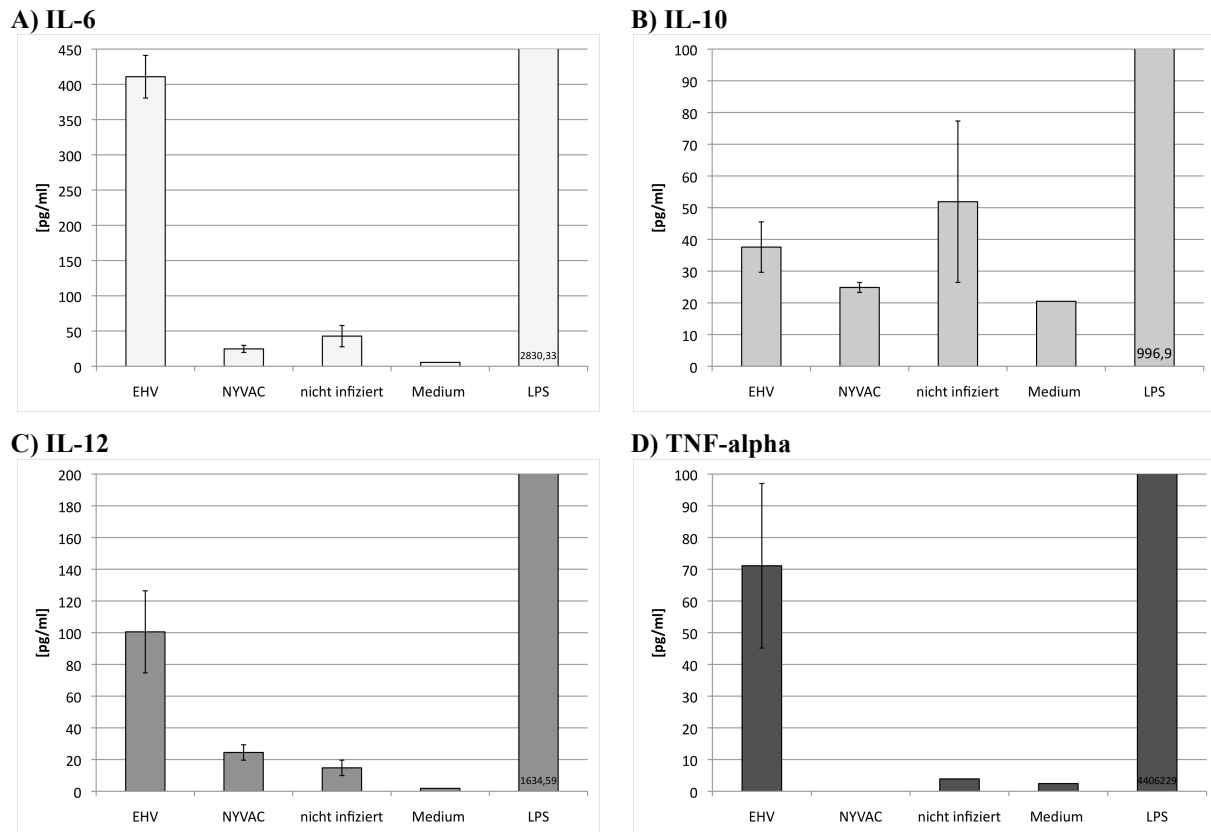


Abbildung 3.11

Interleukin Gehalt nach Stimulation von MDDCs mit dem Überstand infizierter autologer PBMCs

Nachdem MDDCs mit dem Überstand infizierter autologer PBMCs stimuliert wurden, wurde der Zytokingehalt mittels ELISA gemessen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von zwei unterschiedlichen Spendern. Der Überstand EHV-C infizierter PBMCs bewirkt mehr IL-6 Gehalt als der Überstand NYVAC-C infizierter PBMCs (A). Auch der IL-12 und TNF-alpha Gehalt in der „EHV-C Probe“ ist im Trend mehr als in der „NYVAC-C Probe“ (C)(D). Wird die hohe Standardabweichung der „nicht infizierten Probe“ in (B) berücksichtigt, hat die „EHV-C Probe“ auch tendenziell mehr IL-10 Gehalt als die „NYVAC-C Probe“.

3.8 Cross Priming von T-Zellen durch MDDCs, die vorher mittels autologer infizierter Fibrozyten stimuliert wurden

Das *Cross Priming* Potential von MDDCs mit EHV und NYVAC in einem autologen System mit Fibrozyten wurde einerseits durch eine Maturierung immaturer MDDCs bestimmt. Dafür wurden für mature MDDCs spezifische Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse gemessen. Mit der Hypothese, dass reife MDDCs die Fähigkeit besitzen, zytotoxische T-Zellen zu primen. Um die Maturation der dendritischen Zellen über die infizierten Fibrozyten mit einer direkten Infektion der MDDCs zu vergleichen wurden zusätzlich noch direkte Maturationsversuche durchgeführt.

Da in den Vorversuchen hauptsächlich die Expression spezifischer MDDC-Oberflächenmarker als Surrogatparameter für das *Cross Priming* Potential von MDDCs

verwendet wurde, wurde abschließend als Endpunkt zur Bestimmung des *Cross Priming* Potentials die erfolgreiche Stimulation von T-Zellen definiert. Dafür wurden die MDDCs mit infizierten Fibrozyten inkubiert und danach in Co-Kultur mit HIV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen gebracht. Die Interferon- γ Produktion der T-Zellen wurde mit einem Elispot-Assay gemessen und diente als Maß für das stattgefundene *Cross Priming*.

3.8.1 FACS-Analyse der Oberflächenmarkerexpression der MDDCs

In den folgenden beiden Punkten wurden mit den MDDCs vom gleichen Spender Stimulationsversuche durchgeführt. Dabei wurden die iMDDCs einmal direkt mit EHV und NYVAC stimuliert und einmal indirekt über das in dieser Arbeit etablierte autologe System.

3.8.1.1 FACS-Analyse der MDDC Oberflächenmarkerexpression nach Infektion mit NYVAC-C/EHV-C in verschiedenen MOIs

Die mit EHV-C oder NYVAC-C infizierten iMDDCs wurden 24 Stunden stimuliert und danach zur FACS-Analyse vorbereitet. Teilweise wurden die Viren vor der Infektion mit UV-Strahlung inaktiviert.

Für den Oberflächenmarker CD80 zeigte sich mit EHV-C bei einer MOI von 0,1 eine Expression von 84,86%. Auch bei einer MOI von 0,05 wurde ein ähnlich hoher Wert mit 84,4% gemessen. Der niedrigste Wert liegt bei 29,94 mit einer MOI von 10. Die inaktivierten Viren zeigten eine Expression von 77,92%. Wurden die MDDCs mit NYVAC-C stimuliert war die Expression von CD80 geringer. Dabei zeigten sich die höchsten Werte mit einer MOI 0,1, 0,05 und 0,01 um die 64%.

Für CD83 konnte mit EHV-C bei einer MOI von 0,05 der höchste Wert mit 3,1% gemessen werden. Mit NYVAC-C wurde der Oberflächenmarker CD83 bei einer MOI von 0,01 auf 2,5% hochreguliert, alle anderen MOIs rufen eine geringere Expression hervor.

CD86 zeigt mit EHV-C in einer MOI von 1 eine Expression von 67,71%. Stimuliert mit inaktivierten Viren in der gleichen MOI erreicht CD86 eine ähnliche Expression mit 68,8%. NYVAC-C erreicht CD86 Expression von 40,57% mit einer MOI von 1, inaktiviert von 44,69%.

Der Oberflächenmarker HLA-DR wird am höchsten durch EHV-C mit einer MOI von 0,1 auf 99,16% hochreguliert. NYVAC-C erreicht die höchste Stimulation auf einen Wert von 98,05% mit einer MOI von 0,01.

EHV-C konnte den Marker CD40 auf 36,76% mit einer MOI von 1 hochregulieren, inaktiviert auf 35,24%. Bis auf eine MOI von 0,05 liegen die Werte mit anderen MOIs deutlich darunter. NYVAC-C erreicht lediglich bei einer MOI von 1 23,76%, inaktiviert ein ähnliches Ergebnis mit 22,76%, jedoch verglichen mit nicht infizierten MDDCs kaum höher.

Der Oberflächenmarker CCR7 wird durch EHV-C insgesamt kaum hochreguliert, am höchsten durch inaktivierte Viren auf 1,97%. Auch durch NYVAC-C findet keine Hochregulierung des Markers CCR7 statt.

Immature MDDCs weisen eine CD80 Expression von 9,9%, eine CD83 Expression von 1,28%, eine HLA-DR Expression von 98,59%, eine CD86 Expression von 25,63%, eine CD40 Expression von 5,67% und eine CCR7 Expression von 1,28% auf.

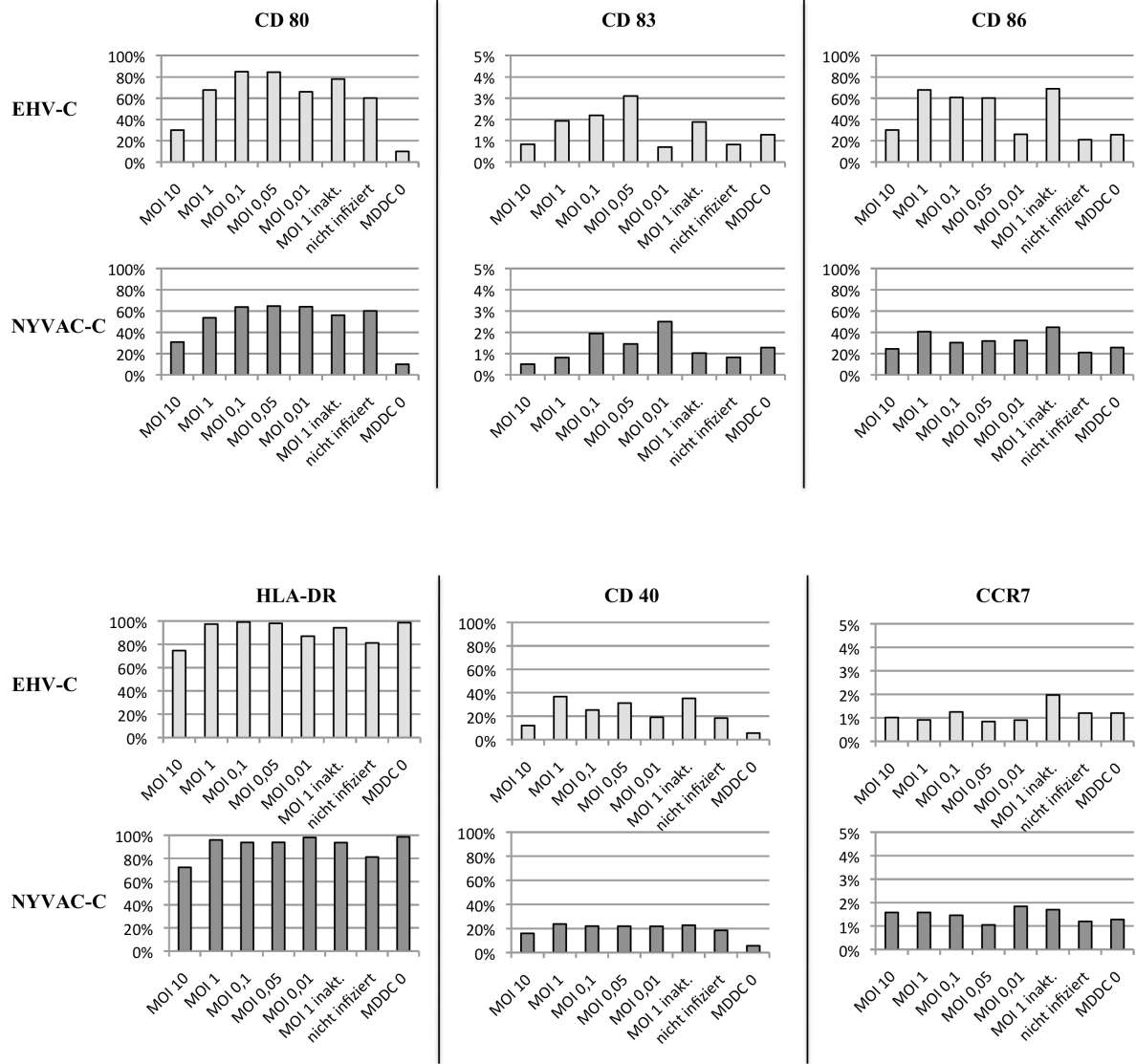


Abbildung 3.12

Oberflächenmarkerexpression von MDDCs nach direkter Infektion mit EHV-C oder NYVAC-C in verschiedener MOI

MDDCs wurden mit EHV-C oder NYVAC-C verschiedener MOI direkt infiziert. Die Inaktivierung des Virus mit $6 \times 0,12 \text{ J/cm}^2$ zeigt im Vergleich mit den nicht inaktivierten Viren keine Unterschiede in der Oberflächenmarkerexpression der MDDCs. Die Oberflächenmarkerexpression bei den MDDCs ist am geringsten, wenn mit einer MOI 10 infiziert wurde. Auch eine Infektion mit einer MOI 0,01 bewirkt weniger Oberflächenmarkerexpression auf MDDCs als eine Infektion mit MOI 1-0,05.

3.8.1.2 FACS-Analyse der MDDC Oberflächenmarkerexpression nach Stimulation durch infizierte autologe Fibrozyten

Die iMDDCs wurden mit Überstand EHV-C oder NYVAC-C infizierter Fibrozyten, inaktiviertem Überstand, dem daraus resultierendem Pellet und infizierten Fibrozyten im Ganzen stimuliert. Dabei zeigte sich, dass die Expression von spezifischen Oberflächenmarkern am höchsten durch die Stimulation mit infizierten Fibrozyten im Ganzen gemessen wurde. Außerdem zeigt sich bei dieser Variante der MDDC-Stimulation auch bei NYVAC-C eine Hochregulierung der Oberflächenmarker, am deutlichsten bei CD86, CD40 und CCR7. Verglichen mit der direkten Stimulation durch EHV-C und NYVAC-C werden die MDDCs insgesamt indirekt besser stimuliert und erzielen höhere Expressionen der Oberflächenmarker. Auch wenn NYVAC-C in Form infizierter Fibrozyten im Ganzen verglichen mit direkter Infektion oder nur dem Überstand infizierter Fibrozyten deutlich eine Hochregulierung der Oberflächenmarker zeigt, werden die iMDDCs von EHV-C mehr stimuliert.

Der Überstand der Fibrozyten erreicht mit EHV-C eine CD80 Expression von 94,16%, eine CD83 Expression von 9,21%, eine CD86 Expression von 76,13%, eine HLA-DR Expression von 52,27% und eine CCR7 Expression von 2,98%. Der Überstand NYVAC-C infizierter Fibrozyten erreicht keine nennenswerte Stimulation verglichen mit nicht infiziertem Überstand.

Wurde der Fibrozytenüberstand vor Stimulation mit UV-Strahlung inaktiviert, erreicht EHV-C leicht niedrigere Expressionswerte als ohne Inaktivierung. Jedoch wird auch mit inaktiviertem Überstand EHV-C infizierter Fibrozyten eine CD80 Expression von 86,93%, eine CD83 Expression von 6,22%, eine CD86 Expression von 54,74%, eine HLA-DR Expression von 95,89%, eine CD40 Expression von 40,16% und eine CCR7 Expression von 3,34%. Diese Werte liegen wieder deutlich über denen, die durch den Überstand NYVAC-infizierter Fibrozyten zustande kommen.

Werden die iMDDCs mit dem gelösten Pellet, das durch die Überstandentnahme resultiert, stimuliert, zeigt sich kein großer Unterschied in der Oberflächenmarkerexpression verglichen mit der Stimulation durch den Überstand und inaktivierten Überstand infizierter Fibrozyten. Auch hier erreicht EHV-C die höchsten Expressionswerte mit CD80 91,92%, CD83 11,16%, CD86 70,26%, HLA-DR 95,51%, CD40 51,62% und CCR7 4,01%. Eine Stimulation mit dem Pellet NYVAC-C infizierter Fibrozyten resultiert in einem ähnlichen Oberflächenmarkerprofil wie mit dem Pellet nicht infizierter Fibrozyten.

Die Stimulation mit infizierten Fibrozyten ohne Auftrennung in Überstand und Pellet zeigt ein anderes Oberflächenmarkerprofil als die drei anderen Varianten. Mit EHV-C werden bei allen Oberflächenmarkern deutlich höhere Werte erreicht. CD80 erreicht einen Wert von 95,44%, CD83 von 23,58%, CD86 von 92,2%, HLA-DR von 99,33%, CD40 von 64,41% und CCR7 von 11,64%. Interessanterweise ist bei diesem Stimulationsversuch auch bei NYVAC-C eine Hochregulierung verglichen mit nicht infizierten Fibrozyten zu erkennen. Während die Werte von CD80, CD83 und HLA-DR ähnlich der nicht nicht infizierten Kontrolle liegen, wird CD 83 auf 56,43%, CD40 auf 44,86% und CCR7 auf 12,22% hochreguliert.

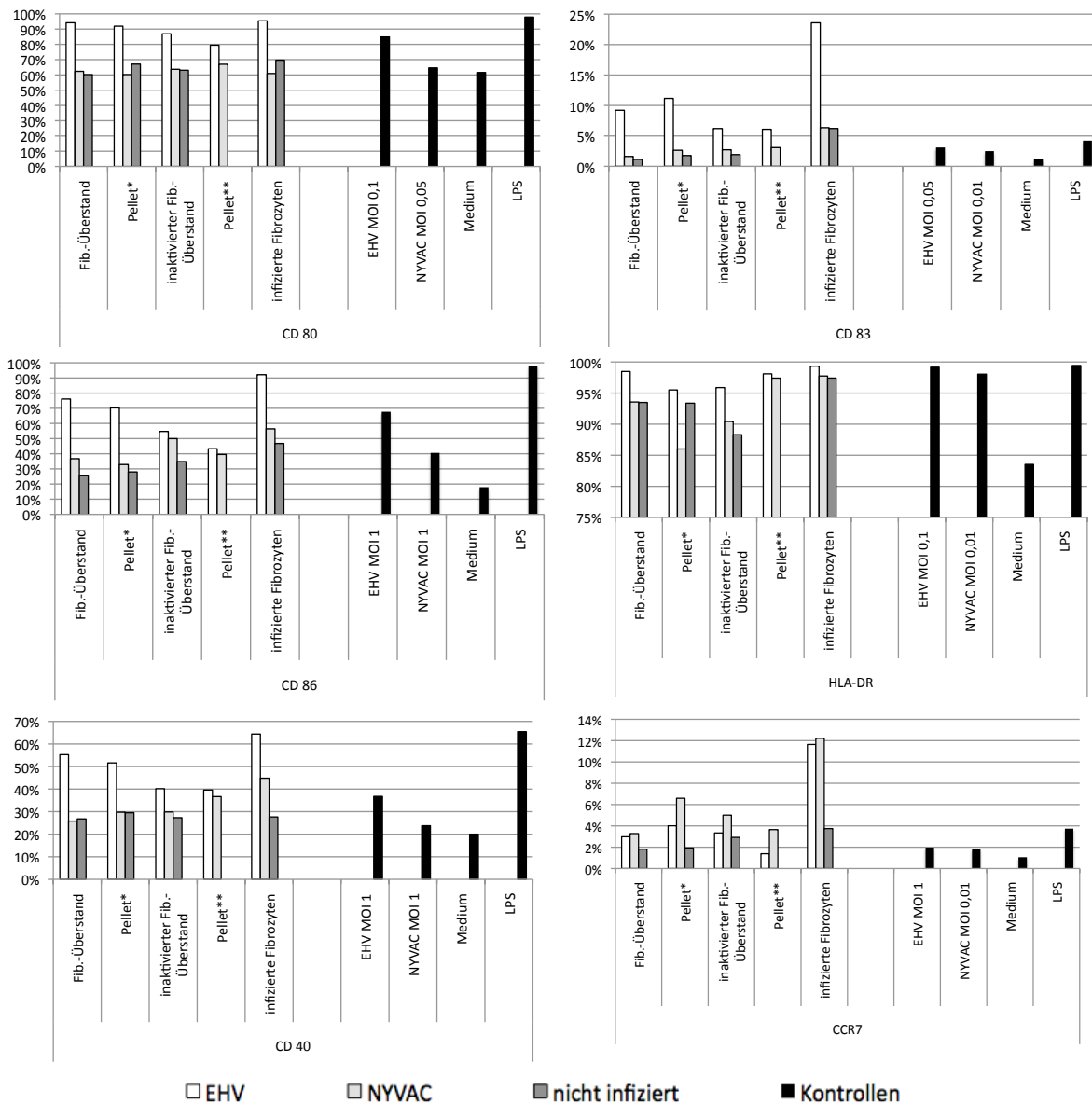


Abbildung 3.13

Oberflächenmarkerexpression von MDDCs nach Stimulation mit infizierten autologen Fibrozyten

Nach der Infektion der Fibrozyten mit EHV-C oder NYVAC-C wurde der Ansatz in Überstand oder Pellet getrennt und die MDDCs mit entweder dem Überstand, dem Pellet oder den infizierten Fibrozyten ohne Auftrennung stimuliert. Als Kontrollen dienten neben nicht stimulierten und LPS stimulierten MDDCs die Oberflächenmarkerexpression von MDDCs des gleichen Spenders, die direkt mit EHV oder NYVAC infiziert wurden, jeweils mit der MOI, die in 3.8.1.1 die höchste Expression bei MDDCs zeigte.

Während die Stimulation mit Fibrozyten-Überstand, dem Pellet, einmal auch inaktiviert, im Vergleich keine besonderen Unterschiede zeigt, erreicht die Oberflächenmarkerexpression aller gemessenen Marker durch die Stimulation mit infizierten Fibrozyten bei allen Markern die höchste Expression, dies besonders deutlich bei CD 83, CD 86, CD 40 und CCR7. Die CCR7-Hochregulierung erfolgt am meisten durch NYVAC infizierte Fibrozyten, die dann die MDDCs stimulieren.

3.8.2 Interferon- γ Sekretion von T-Zellen nach *Cross Priming* mit EHV-B und NYVAC-B durch verschiedenartig stimulierte MDDCs

Bisher wurde als Endpunkt für das *Cross Priming* Potential von MDDCs eine Maturation der MDDCs gewählt. Damit konnte jedoch nicht sicher davon ausgegangen werden, dass auch CD8⁺ Zellen aktiviert werden. Deshalb wurden in das bereits etablierte autologe System HLA-kompatible CD8⁺ T-Zellen integriert. Um eine erfolgte Aktivierung zu detektieren, wurden CD8⁺ T-Zellen gewählt, die bereits Kontakt mit dem HI-Virus hatten und ein spezifisches Epitop erkennen können (HIV+ CD8⁺ T-Zellen). Durch den erneuten Kontakt mit den MDDCs, die durch Fibrozyten stimuliert wurden, produzierten die zytotoxischen T-Zellen Interferon- γ . Dies wurde mit einem Elispot-Assay gemessen.

Wenn die iMDDCs mit EHV-B direkt stimuliert wurden, konnte nach Co-Kultur mit den CD8⁺ T-Zellen 207 SFU/10⁵ Zellen gemessen werden. Mit NYVAC-B war die Interferon- γ Produktion weniger bei 144 SFU/10⁵ Zellen. Nicht infizierte MDDCs erreichten bei den zytotoxischen T-Zellen eine Interferon- γ Produktion von 151 SFU/10⁵ Zellen. In der Abbildung sind bei der direkten Infektion von MDDCs die Mittelwerte jeweils zweier *Cross Priming* Versuche gezeigt.

Wurde zur Stimulation der iMDDCs der Überstand EHV-B infizierter Fibrozyten verwendet, konnte die Interferon- γ Produktion mit 190 SFU/10⁵ Zellen gemessen werden. NYVAC-B erreicht nur einen Wert von 118 SFU/10⁵ Zellen. Die mit nicht infizierten Fibrozyten stimulierten MDDCs regten die CD8⁺ T-Zellen zu einer Interferon- γ Produktion von 190 SFU/10⁵ Zellen an.

Schließlich wurde auch das Pellet, das durch die Überstandentnahme entstand, zur Stimulation von MDDCs verwendet. Mit EHV-B kann bei den CD8⁺ T-Zellen eine Interferon- γ Produktion von 196 SFU/10⁵ Zellen gemessen werden. NYVAC-B erreicht einen Wert von 195 SFU/10⁵ Zellen. Nicht infiziertes Fibrozytenpellet erreicht dagegen nur einen Wert von 162 SFU/10⁵ Zellen.

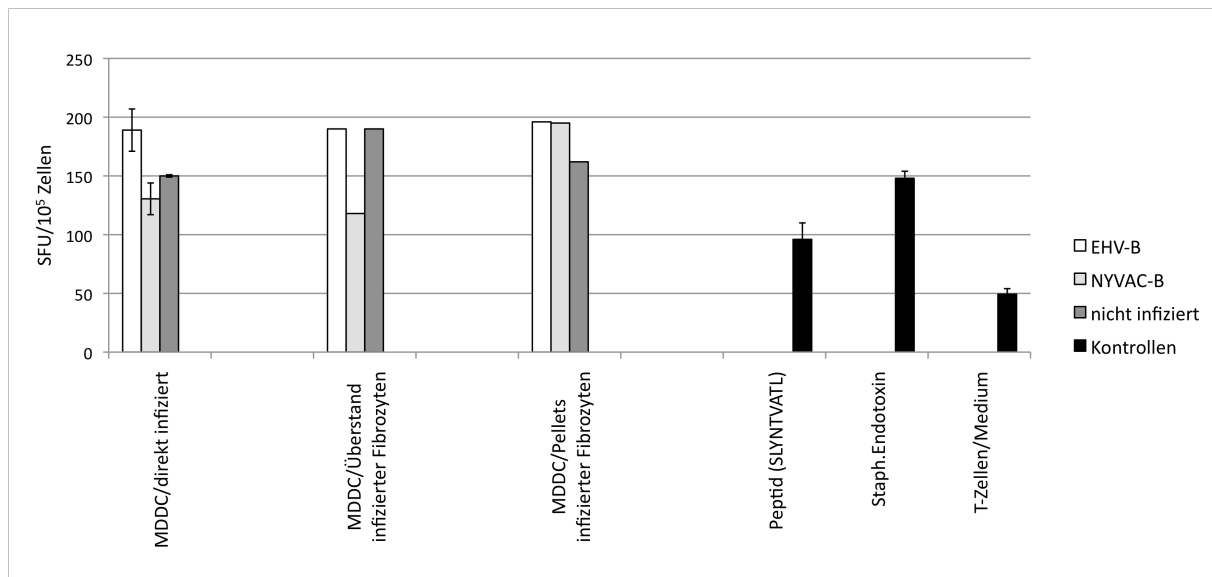


Abbildung 3.14

Interferon- γ Sekretion von T-Zellen nach *Cross Priming* mit EHV-B und NYVAC-B

MDDCs wurden entweder durch direkte Infektion mit EHV-B oder NYVAC-B, durch den Überstand infizierter autologer Fibrozyten oder das übriggebliebene Pellet stimuliert. Daraufhin wurden die so maturierten MDDCs mit HIV+ CD8⁺ T-Zellen inkubiert. Die Interferon- γ Produktion der T-Zellen wurde mittels Elispot gemessen.

In allen Ansätzen ist bei EHV-B die höchste Interferon- γ Produktion zu messen. Werden die HIV+ CD8⁺ T-Zellen mit MDDCs, die vorher mit dem Pellet NYVAC-B infizierter Fibrozyten stimuliert wurden, inkubiert, resultiert eine ähnliche Interferon- γ Produktion wie im Vergleich zu EHV-B. Die direkte Infektion mit NYVAC-B oder die Stimulation mit dem Überstand NYVAC-B infizierter Fibrozyten bewirkt bei den HIV+ CD8⁺ T-Zellen weniger Interferon- γ Produktion als der nicht infizierte Ansatz.

4 Diskussion

4.1 MRC-5 Zellen stimulieren die Oberflächenmarkerexpression von MDDCs

Um das *Cross Priming* Potential von MDDCs mittels der Vakzinekandidaten EHV und NYVAC zu testen, wurden MRC-5 Zellen mit EHV oder NYVAC infiziert. Die abzentrifugierten Überstände wurden zusammen mit MDDCs inkubiert. Danach ließ sich Oberflächenmarkerexpression der MDDCs durch FACS-Analyse bestimmen.

Wegen ihrer charakteristischen fibroblastischen Morphologie und der einfachen Handhabung in Zellkultur wurden zunächst MRC-5 Zellen als geeignete Zelllinie für die Versuchsreihe gewählt. Außerdem überzeugte ihre besondere Empfänglichkeit für humane Virusinfektionen. MRC-5 Zellen werden mit langjähriger Erfahrung in der Vakzineentwicklung insbesondere für Virusisolationen eingesetzt.³⁶

Die FACS-Analyse der MDDCs zeigte deutlich eine etwa gleich hohe Oberflächenmarkerexpression durch den Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen wie durch den Überstand EHV- oder NYVAC-infizierter MRC-5 Zellen. Um auszuschließen, dass nicht das verwendete FKS-Medium in den Proben eine dementsprechende Stimulation bzw. Maturation der MDDCs bewirkt, wurde für den Versuchsansatz einmal FKS-Medium und einmal ABS-Medium verwendet. Dabei zeigte sich bei Gebrauch von ABS-Medium insgesamt weniger Oberflächenmarkerexpression, sichtbar bei CD80, CD83, CD40 und CCR7 (vgl. Abb. 3.2). Dennoch stimulierte auch hier der Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen die MDDCs in gleicher Weise wie der Überstand EHV- und NYVAC infizierter MRC-5 Zellen. Schließlich erhielt der Versuchsansatz eine zusätzliche Negativkontrolle zugefügt. Verglichen wurde die Stimulation der MDDCs durch den Überstand EHV-C- oder NYVAC-C-infizierter MRC-5 Zellen mit dem Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen und der Stimulation mit Medium (ohne Kontakt zu MRC-5 Zellen). Dabei zeigte sich, dass diese Probe, die keinen Kontakt zu MRC-5 Zellen hatte, die Oberflächenmarker der MDDCs wesentlich weniger hochreguliert als die Proben, die mit MRC-5 Zellen in Kontakt waren. Das zeigte: MDDCs reagieren empfindlich mit einer Maturation alleine durch Medium, das mit MRC-5 Zellen in Kontakt war.

Immature dendritische Zellen können Antigene über verschiedene Wege aufnehmen: (1) durch Makropinozytose, (2) Rezeptor-vermittelt z.B. durch Endozytose via C-type lectin Rezeptoren, (3) durch Phagozytose von Partikeln, apoptotischen und nekrotischen Zellfragmenten, Viren und Bakterien.¹⁸ Gerade die Antigen-Aufnahme von virusinfizierten

apoptotischen Zellen maturiert DCs effektiv und befähigt sie zum *Cross Presentation* der viralen Antigene.³⁷ Eine Maturation von iDCs durch den Antigenaustausch von lebenden Zellen ist ebenfalls beschrieben.³⁸ Die Maturierung von dendritischen Zellen durch den Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen legt einen zusätzlichen Weg zur Maturation von iDCs nahe.

Kis et al. zeigte in seinen Versuchen, dendritische Zellen mit dem Überstand Cytomegalievirus-infizierter MRC-5 Zellen zu stimulieren, dass die CD80, CD83 und HLA-DR Expression auf MDDCs nach Stimulation mit dem Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen (Mock) deutlich weniger ausgeprägt war als nach Stimulation mit dem Überstand CMV-infizierter MRC-5 Zellen. Jedoch wurde die Oberflächenmarkerexpression von MDDCs auch nach Tag 7 und Tag 10 gemessen, nicht wie im vorliegenden Versuch nur nach 24 Stunden.³⁹ Zum Beispiel zeigt sich im Vergleich zur Mock-Probe eine Hochregulierung der Oberflächenmarker CD40, CD83, CD86 und HLA-DR auf den MDDCs durch die Überstände CMV infizierter MRC-5 Zellen erst am Tag 10, während am Tag 1 noch kein Unterschied in der Oberflächenmarkerexpression zwischen dem Überstand infizierter und nicht infizierter MRC-5 Zellen zu sehen ist. Da Kis et al. keine zweite Negativkontrolle vorweist, z.B. nur Medium alleine, und der Unterschied der Oberflächenmarkerhochregulierung zwischen infizierter und nicht infizierter Proben erst am Tag 10 detektiert wird, können die unterschiedlichen Ergebnisse der Versuche nicht direkt miteinander verglichen werden.

4.2 Autologes *in vitro* Modell zur Untersuchung des *Cross Priming* Potentials von EHV-C und NYVAC-C

Da MDDCs von einer allogenen Zelllinie wie den MRC-5 Zellen stimuliert werden, wurde ein autologer Versuchsansatz entwickelt. Dafür wurden PBMCs und CD14⁺ Zellen aus buffy coat isoliert und kryokonserviert. Vom gleichen Spender wurden auch MDDCs generiert. Die autologen PBMCs und CD14⁺ Zellen wurden mit EHV-C oder NYVAC-C infiziert und die Überstände mit den MDDCs zusammen inkubiert. Anschließend wurde wieder die Oberflächenmarkerexpression auf den MDDCs gemessen.

Es ließ sich zeigen, dass die MDDCs mit dem Überstand nicht infizierter PBMCs/CD14⁺ Zellen nicht stimuliert wurden. Die Oberflächenmarkerexpression war ähnlich niedrig wie die Expression nach der Stimulation mit Medium, das nicht in Kontakt mit den autologen PBMCs/CD14⁺ Zellen war. Offensichtlich existiert kein löslicher Faktor, der von autologen PBMCs/CD14⁺ in den Überstand abgegeben wird und die MDDCs stimuliert.

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Maturation von MDDCs mit dem Überstand nicht infizierter MRC-5 Zellen oder autologer PBMCs/CD14⁺ Zellen beruhen offensichtlich auf der HLA-Inkompatibilität der verwendeten Zelllinien. Im vorliegenden Versuch wurden die iDCs nicht durch direkten Zellkontakt maturiert (Überstand nicht infizierter Zellen). Zellkulturen scheinen also in ihre Mikroumgebung lösliche Stoffe abzugeben, die von iDCs als fremd erkannt werden. Um welche Stoffe es sich dabei handelt und wie sie iDCs aktivieren und maturieren, war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

4.3 Zwei unterschiedliche *in vitro* Modelle zur Untersuchung des *Cross Priming* Potentials von MDDCs liefern vergleichbare Ergebnisse: „Transwellversuch“ vs. „Stimulation mit Überstand infizierter Zellen“

Um das *Cross Priming* Potential von MDDCs zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche *in vitro* Modelle verwendet. Zum einen wurden geeignete Zellen mit EHV-C oder NYVAC-C infiziert. Nach dem Abzentrifugieren der infizierten Zellen wurde der verbleibende Überstand zu den iMDDCs gegeben, um iMDDCs zu maturieren. Zum anderen wurden geeignete Zellen in Transwells mit EHV-C oder NYVAC-C infiziert. Nach dem Wegwaschen des Virus wurden diese infizierten Zellen mit den iMDDCs inkubiert, getrennt durch die Membran der Transwells.

Bei der Gewinnung der Überstände durch Zentrifugation sollte das Virus aus den Überständen entfernt werden, so dass eine direkte Infektion der iMDDCs ausgeschlossen werden konnte. Obwohl eine absolute Eliminierung des Virus nicht nachweisbar war, kann davon ausgegangen werden, dass sich die MOI in den Überständen durch die Zentrifugation deutlich reduziert haben muss. Dies bestätigte sich auch in den zur Probe durchgeführten Virustitrationen der Überstände, jedoch konnte keine valide Methode zur Virustitration etabliert werden, weshalb die Ergebnisse in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Auch bei der Co-Culture von iMDDCs und infizierten Zellen mittels Transwells kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass kein Virus die MDDCs direkt infiziert hat. Wenn aber eine direkte Infektion stattfand, dann sicherlich mit einer geringeren MOI.

Die Maturation der iMDDCs erfolgte sowohl durch eine direkte Infektion mit entweder EHV-C oder NYVAC-C, als auch durch Stimulation durch Co-Faktoren. Dabei zeigte sich, dass die mit Überstand, also mit Virus und costimulatorischer Faktoren, stimulierten iMDDCs deutlich mehr Oberflächenmarkerexpression aufweisen als die direkt infizierten iMDDCs (vgl. Abbildung 3.13).

Hinsichtlich der Ergebnisse unterscheiden sich beide *in vitro* Modelle nicht und scheinen für die Untersuchung des *Cross Priming* Potentials geeignet zu sein. In beiden Experimenten kann bei den MDDCs eine ähnliche Oberflächenmarkerexpression gemessen werden.

4.4 EHV-infizierte autologe PBMCs haben eine höhere intrazelluläre p24 Expression als NYVAC-infizierte autologe PBMCs

Da für die autologen Zellkulturexperimente Überstand infizierter PBMCs verwendet wurden, sollte die intrazelluläre p24 Expression in PBMCs nach der Infektion gemessen werden, um zu zeigen, dass sich PBMCs auch effektiv mit EHV-C oder NYVAC-C infizieren lassen.

Es bestätigte sich, dass PBMCs mit EHV-C effektiv infiziert werden, während nach Infektion mit NYVAC-C fast keine p24-Expression nachzuweisen ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit beruht dieser Unterschied wohl auf einem bei Poxviridae bekannten Block des Infektionszyklus' von MDDCs.⁴⁰ Ähnliche Mechanismen könnten auch für die Infektion von PBMCs mit NYVAC-C gelten.

Die Annahme, dass immature MDDCs durch NYVAC-C infizierte PBMCs beziehungsweise durch deren costimulatorischer Signale doch zu murenen MDDCs stimuliert werden können, die dann wiederum zytotoxische T-Zellen aktivieren können, war Gegenstand der folgenden Untersuchungen. Verschiedene Vorstellungen, warum MDDCs trotzdem *in vivo* eine ausreichende Immunantwort generieren stützen diese Hypothese.⁴¹ Einerseits könnte eine ausreichende Anzahl dendritischer Zellen eine Vaccinia-Virus-Infektion überleben, um dann eine effiziente T-Zell Antwort zu initiieren. Andererseits könnte das Phänomen *Cross Presentation* für die Ausbildung einer Immunogenität *in vivo* verantwortlich sein. Dabei wird das Virus von dendritischen Zellen phagozytiert und zytotoxische T-Zellen werden durch Virusantigenpräsentation via MHC I aktiviert, dies unter Umständen auch verstärkt durch gleichzeitige Aufnahme von apoptotischen infizierten Zellen.⁴² Insgesamt muss zwischen einer generellen Aktivierung des Immunsystems und einer Immunantwort auf ein spezifisches HIV-Antigen wie gag, pol oder nev unterschieden werden. So schließt eine ausbleibende p-24 Expression nach NYVAC-Infektion eine adäquate Immunantwort nicht aus, da die Aktivierung des Immunsystems auch durch andere nicht HIV-spezifische virulente Komponenten erreicht werden kann.

4.5 Aus PBMCs oder CD14⁺ Zellen lassen sich Fibrozyten generieren

Um in einem autologen *in vitro* Modell das *Cross Priming* Potential von EHV-C und NYVAC-C zu untersuchen, mussten die zu infizierenden Zellen, deren Überstand dann die iMDDCs stimulierte, vom gleichen Spender stammen wie die verwendeten iMDDCs. Zusätzlich sollten die zu infizierenden Zellen fibrozytenähnliche Eigenschaften haben.

Chesney et. al beschreibt ein Verfahren, Fibrozyten aus PBMCs zu gewinnen. Fibrozyten sind eine aus dem Blut stammende Zellpopulation. Sie sind in der Lage, zum Ort einer Gewebeverletzung zu wandern und verschiedene Matrixmoleküle zu bilden. Außerdem gibt es Hinweise, dass Fibrozyten als antigenpräsentierende Zellen fungieren und eine spezifische T-Zell-Antwort generieren können.⁴³

Zur Gewinnung von Fibrozyten wurden bisher in anderen Arbeiten PBMCs isoliert, in Fibronektin gecoateten Zellkulturflaschen 10-12 Tage kultiviert und mittels FACS Analyse des hämatopoetischen Stammzellantigens CD34 und des von Fibroblasten produziertem Kollagens I verifiziert.⁴³ Neuere Untersuchungen legen nahe, dass die Fibrozyten überwiegend aus CD14⁺ Zellen entstehen.⁴⁴

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fibrozyten besser aus CD14⁺ Zellen generiert werden können als aus PBMCs. Dabei wurde die Fibrozytenentwicklung zunächst nur nach ihrer mikroskopisch typischen spindelförmigen Morphologie beurteilt. Nach 13-14 Tagen waren die wells am dichtesten mit Fibrozyten bedeckt. Zuletzt wurden die Fibrozyten durch ihre Produktion von Kollagen I mittels FACS-Analyse verifiziert. Nahezu alle Zellen wurden so als Kollagen I positiv charakterisiert. Ausgehend davon, dass alle Kollagen I positiven Zellen auch CD34 positiv waren, wurde eine CD34 FACS-Analyse nicht durchgeführt. Weitere Versuche von Chesney et. al bestätigten, dass die CD14⁺ Zellen initial kein Kollagen I produzierten. Im Verlauf von zwei Wochen aber wiesen die nun gereiften Fibrozyten keinen CD14 Marker mehr auf und produzierten Kollagen I.⁴⁵

4.6 Der Überstand EHV-infizierter autologer Fibrozyten stimuliert die Oberflächenmarkerexpression von MDDCs mehr als der Überstand NYVAC-infizierter autologer Fibrozyten

Nach der Infektion von Fibrozyten mit EHV-C und NYVAC-C wurde ihr Überstand dazu verwendet, iMDDCs vom gleichen Spender für 24 und für 48 Stunden zu stimulieren.

In mehreren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die MDDC Oberflächenmarker CD80, CD83, HLA-DR und CD86 nach der Inkubation mit dem EHV-C Überstand als Zeichen einer Maturation deutlich hochreguliert wurden. Zusätzlich wurde in einem Versuch mittels FACS-Analyse die MDDC Oberflächenmarkerexpression nach direkter Infektion mit NYVAC-C bzw. EHV-C in verschiedenen MOIs gemessen. Die MOI mit der jeweilig höchsten MDDC Oberflächenmarkerexpression wurde mit der Oberflächenmarkerexpression der MDDC vom gleichen Spender nach Inkubation nur mit dem Überstand EHV-C- oder NYVAC-C infizierter Zellen verglichen. Bis auf den HLA-DR Rezeptor zeigte sich nach Inkubation der MDDCs mit dem Überstand EHV-C infizierter Fibrozyten eine durchweg höhere Oberflächenmarkerexpression. Wie unter 4.3 ausgeführt kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Maturation der iMDDCs allein durch costimulatorische Faktoren im Überstand der infizierten Fibrozyten erfolgte. Vielmehr ist anzunehmen, die Stimulation der iMDDCs erfolgte auch durch einen Restanteil des lebenden Virus, jedoch verstärkt durch eben die costimulatorischen Faktoren, die durch die Fibrozyten zusätzlich in den Überstand abgegeben wurden.

Janeway entwickelte die Hypothese, dass antigenpräsentierende Zellen (APCs) Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) besitzen, die in der Evolution entstandene pathogene Moleküle erkennen können. Diese pathogen associated molecular pattern (PAMPs) sind weit verbreitet.⁴⁶ Reis e Sousa erweitert diesen Gedanken und stellt fest, dass viral infizierte Zellen ebenfalls PAMPs erkennen und APCs zusätzlich aktivieren, indem sie proinflammatorische Zytokine (i) produzieren. Genauer untersucht ist die Aktivierung der Proteinkinase PKR durch viral produzierte dsRNA, die von PRRs im Zytosol erkannt wird. Dies führt unter anderem zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und resultiert letztlich in transkriptionalen und translationalen Signalen, die die Zelle zur Produktion proinflammatorischer Zytokine anregen.⁴⁷⁻⁴⁹

TLR-7 wird auf plasmazytoiden DCs expremiert und scheint influenzavirale Komponenten zu erkennen, die von den virusinfizierten Zellen freigesetzt werden. Das führt insgesamt zu einer Aktivierung der DCs über TLR-7 (ii).⁵⁰

Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Aktivierung von DCs durch Hitzeschockproteine (iii), die von nekrotischen, aber nicht von apoptotischen Zellen freigesetzt werden.^{49, 51}

Savill et al. teilt formal den Zelluntergang in Apoptose, primäre und sekundäre Nekrose ein. Dabei bezeichnet Apoptose den programmierten Zelltod. Bei der primären Nekrose schädigen z.B. Hypoxie oder das Einwirken starker Noxen die Zellen passiv von außen. Sekundäre

Nekrose findet statt, wenn phagozytierenden Zellen apoptotische Zellen nicht aufnehmen. Sekundäre Nekrose stellt also ein Kontinuum zur initial stattgefundenen Apoptose dar.⁵²

Nach Infektion mit Vaccinia Virus werden die Zellen apoptotisch, da in dem rekombinanten Virus im Gegensatz zu den Pockenviren (Nekrose) der apoptosis preventing factor fehlt.⁵³

Dass auf eine NYVAC-Infektion keine Aktivierung von dendritischen Zellen erfolgt, wird gestützt von der Beobachtung von Basu et al., dass nur nekrotische, aber nicht apoptotische Zellen proinflammatorisch wirkende Hitzeschockproteine freisetzen.⁵¹ Üblicherweise bleibt eine adäquate Maturation von dendritischen Zellen durch den Kontakt mit apoptotischen Zellen aus.⁵² Darüberhinaus gibt es jedoch die Erkenntnis, dass apoptotische Zellen dendritische Zellen aktivieren können, wenn sie zusammen mit antigenen Strukturen aufgenommen werden.^{52, 54} In dem Überstand der NYVAC-infizierten Fibrozyten war mutmaßlich jedoch außer Virus weder ein proinflammatorisches Zytokinprofil, noch die Strukturen apoptotischer oder sekundär nekrotischer Fibrozyten enthalten, die im Zusammenhang mit den viralen Antigenen verstärkend auf die Aktivierung dendritischer Zellen wirken. Werden die MDDCs ohne Auftrennung mit NYVAC-infizierten Fibrozyten stimuliert, also virale Antigene zusammen mit apoptotischen Zellstrukturen, ist FACS-analytisch tendenziell eine bessere Maturation festzustellen, wie an der Hochregulation von CD40 und CCR7 deutlich zu erkennen ist (vgl. 3.8.1.2 und Abb. 3.13).

Eine Infektion mit equinen Herpesviren führt zu einer latenten Infektion ohne Zelluntergang oder zu einer Lyse mit einer Zellnekrose, jedoch nicht zur Apoptose.⁵⁵ Die bessere Aktivierung der MDDCs durch den Überstand EHV-C infizierter Zellen erscheint, verglichen mit der Aktivierung durch direkte Infektion mit EHV-C, vor diesem Hintergrund konsequent, da der Überstand nicht nur das Virus, sondern auch proinflammatorische Zytokine und auch Hitzeschockproteine zur besseren Stimulation von dendritischen Zellen enthält. Ebenso könnte die bessere Maturierung von MDDCs durch den EHV-Vektor im Gegensatz zur Maturierung durch den NYVAC-Vektor, in welcher Stimulationsform auch immer, auf den unterschiedlichen Zelluntergang nach Infektion (Apoptose vs. Nekrose) zurückzuführen sein. Ähnlich wie zytotoxische T-Zellen nur durch ausreichende Maturierung dendritischer Zellen aktiviert werden können, ist diese Maturierung davon abhängig, wie das Antigen mit den dendritischen Zellen in Kontakt gebracht wird. Das Schicksal der primär infizierten Zellen, Apoptose oder Nekrose, scheint für das *Cross Priming* Potential entscheidend zu sein.

4.7 Erhöhter Gehalt von den Zytokinen IL-6, IL-10, IL-12 und TNF-alpha nach Stimulation der MDDCs mit dem Überstand EHV-infizierter PBMCs

Zur Bestimmung des *Cross Priming* Potentials von dendritischen Zellen wurde in dieser Arbeit vor allem die FACS-Analyse der Oberflächenmarker maturierter dendritischer Zellen verwendet. Das geschah unter der Hypothese, dass die maturierten dendritischen Zellen die Fähigkeit besitzen naive T-Zellen zu primen, sie also auf ein spezifisches Antigen zu sensibilisieren. Um die Hypothese zusätzlich zu stützen, wurde nach der Maturierung der dendritischen Zellen durch den Überstand infizierter Fibrozyten der Zytokingehalt in dem Versuchsansatz untersucht.

Zytokine steuern die zelluläre Immunantwort und spielen eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung der verschiedenen T-Zell-Subtypen, bei der B-Zell Stimulation und bei der Maturierung von dendritischen Zellen.

Die Ergebnisse der Zytokinanalysen lassen einen klaren Trend erkennen. In dem Überstand dendritischer Zellen, die über EHV-C maturiert wurden, befindet sich jeweils mehr Interleukin-6, -10, -12 und TNF-alpha als in dem Überstand der dendritischen Zellen, die über NYVAC-C oder mittels nicht infizierter Zellen maturieren sollten.

Jedoch zeigt sich bei Interleukin-10, Interleukin-12 und TNF-alpha eine sehr geringe Menge an gemessenen Zytokinen. Allenfalls die Ergebnisse von Interleukin-6 lassen aufgrund einer ausreichenden Quantität auch eine qualitative Aussage zu. Entweder gingen bei der schwierigen Probengewinnung relevante Mengen an Zytokinen verloren oder es befanden sich wirklich keine nennenswerten Mengen an Zytokin in den Überständen.

Differenziert werden kann auch nicht, ob der Zytokingehalt in der Probe von den infizierten Fibrozyten stammt, deren Überstand dazu verwendet wurde die MDDCs zu maturieren, oder ob die MDDCs die Zytokine selber produzierten aufgrund einer Maturierung durch den Überstand.

Letztlich lässt sich in den Proben des EHV-C Vektors ein höherer Zytokingehalt als in den Proben des NYVAC-C Vektors oder der nicht infizierten Zellen feststellen. Das spricht erneut dafür, dass durch NYVAC-C keine adäquate Immunreaktion im Sinne eines zytokinhaltigen Milieus ausgelöst wird, weder durch die Infektion der Fibrozyten noch durch die Maturierung von MDDCs über deren Überstände.

4.8 Infizierte Fibrozyten ohne Auftrennung in Überstand und Pellet bewirken bei MDDCs eine höhere Oberflächenmarkerexpression

Die Maturierung von MDDCs durch den Überstand infizierter Zellen funktionierte besser als die Maturierung durch die direkte Infektion der MDDCs. Die Infektion der Fibrozyten unterstützt die Maturierung der MDDCs durch Schaffung eines proinflammatorischen Milieus. Außerdem verstärken infizierte Fibrozyten die Maturation von MDDCs, wenn sie als nekrotische Partikel von MDDCs phagozytiert werden. Anfänglich wurde nur die Maturierung der MDDCs durch den Überstand infizierter Fibrozyten untersucht unter der Annahme, darin befände sich kein Virus mehr. Im Verlauf wurde jedoch klar, dass mit intakten Restvirusanteilen auch in dem Überstand gerechnet werden musste. Dennoch zeigte sich bei den so aktivierten MDDCs eine höhere Oberflächenmarkerexpression als bei den MDDCs, die durch direkte Virusinfektion stimuliert wurden.

Zusätzlich wurde deswegen die Oberflächenmarkerexpression der MDDCs durch Stimulation mit dem Pellet der infizierten Fibrozyten einerseits und den infizierten Fibrozyten ohne Auftrennung durch Zentrifugation andererseits untersucht.

Hier zeigte sich, dass gerade die Stimulation mit unaufgetrennten EHV-C infizierten Fibrozyten deutlich die höchste Expression aller Oberflächenmarker zur Folge hatte. Das unterstützt erneut die Hypothese, dass die Nekrose der Fibrozyten und durch deren Aufnahme durch die MDDCs diese zusätzlich stimulieren. Außerdem macht der vergleichende Versuch auch deutlich, dass die Kombination aus proinflammatorischem Milieu, nekrotisierender Fibrozyten und verbleibenden Viruspartikeln die Maturation der MDDCs verbessert und damit auch ihr *Cross Priming* Potential gesteigert wird (vgl. 4.6). Selbst die Stimulation von MDDCs mit NYVAC-C infizierter Fibrozyten zeigte mehr Effekt als die direkte Infektion mit NYVAC-C. In den Proben mit den unaufgetrennten infizierten Fibrozyten stellte sich der Effekt der besseren Stimulation durch Phagozytose nekrotischer Fibrozyten durch die MDDCs deutlicher dar. Diese Probe enthielt mehr nekrotische Fibrozyten als der Überstand infizierter Zellen. Dieser Effekt zeigt sich vornehmlich bei dem EHV-C-Vektor. Hier ist davon auszugehen, dass die Infektion die Fibrozyten nekrotisch veränderte. Interessanterweise weisen die Oberflächenmarker CCR7 und CD40 eine deutliche Hochregulierung durch den NYVAC-C-Vektor auf. Bisher wurde durch den NYVAC-C-Vektor keine Hochregulierung maturationsspezifischer Oberflächenmarker erreicht.

4.9 Inaktivierung des Virus mit UV-Strahlung ($6 \times 0,12 \text{ J/cm}^2$) ist unzureichend

Für den Ausschluß von aktivem Virus in den Überständen, die für eine Maturation der MDDCs verwendet wurden, sollten diese Überstände durch UV-Bestrahlung inaktiviert werden. Sie wurden mit $6 \times 0,12 \text{ J/cm}^2$ bestrahlt. Dann wurden die so inaktivierten Überstände und die nicht inaktivierten Überstände zur Maturation von MDDCs verwendet. Als Ergebnis zeigte sich, die Oberflächenmarkerexpression der MDDCs war nach Stimulation mit inaktiviertem Überstand insgesamt geringer, als nach Stimulation mit dem nicht inaktivierten Überstand.

Die Inaktivierung des Virus mit UV-Strahlen beruht auf der Zerstörung der DNA des Virus. Das Virus kann sich nicht mehr multiplizieren, Translation und Transskription in der Zelle können nicht mehr ablaufen.⁵⁶ Eine direkte Infektion der MDDCs durch restliches Virus im Überstand wäre somit nicht möglich. Dies ist eine Erklärung für die insgesamt niedrigere Oberflächenmarkerexpression auf den MDDCs nach Stimulation mit dem inaktivierten Überstand. Dennoch zeigt sich eine Oberflächenmarkerexpression, höher als beim Überstand nicht infizierter Zellen. Das Virus könnte immer noch seine strukturellen Komponenten besitzen, die dann als PAMPs von den PRRs der MDDCs erkannt werden. Alleine die PAMPs sind in der Lage, die MDDCs zu maturieren.⁴⁶ Es ist kein aktives Virus erforderlich.

4.10 *Cross Priming* Potential von MDDCs auf T-Zellen mittels EHV und NYVAC

Die durch direkte Virusinfektion oder durch die Überstände der vorher infizierten Fibrozyten maturierten MDDCs wurden dazu verwendet, CD8^+ T-Zellen zu einer Interferon- γ Produktion anzuregen. Die T-Zellen waren HLA-kompatibel und bereits mit HIV Epitopen in Kontakt.³⁵ Der erneute Kontakt mit den MDDCs sollte sie zu einer Interferon- γ Produktion anregen. Indem die T-Zellen mit einer Interferon- γ Produktion reagierten, konnte gezeigt werden, dass die MDDCs durch die erste Co-Kultur mit dem Überstand der infizierten Fibrozyten oder dem Pellet der infizierten Fibrozyten den T-Zellen ein spezifisches Epitop präsentieren können. Zu beobachten war: Die mit Überstand EHV infizierter Fibrozyten maturierten MDDCs regten letztlich bei den T-Zellen eine positive Interferon- γ Produktion an, anders als im Vergleich mit den NYVAC infizierten Fibrozyten. Allerdings zeigt auch die Kontrolle der nicht infizierten Fibrozyten eine deutlich positive Interferon- γ Produktion bei den T-Zellen. Am ehesten scheint eine Verunreinigung oder Fehlmessung dafür verantwortlich zu sein. Wenn das Pellet infizierter Fibrozyten zur MDDCs Maturierung verwendet wurde, zeigten die

T-Zellen nach Co-Kultur mit den MDDCs sogar bei NYVAC eine fast gleiche Interferon- γ Produktion wie bei EHV. Natürlich waren im Pellet auch mehr PAMPs der nekrotisierten Fibrozyten, die in Kombination mit dem Virus eine bessere Maturation der MDDCs erreichen. Sie können dann wiederum die T-Zellen effektiver primen bzw. wie im durchgeführten Versuch die bereits geprimten T-Zellen besser zu einer Interferon- γ Antwort anregen können.

Weil EHV-B nach Infektion von Fibrozyten über MDDCs bei den zytotoxischen T-Zellen eine deutliche Interferon- γ Produktion auslöst, konnte gezeigt werden, dass der virale Vektor EHV-B ein *Cross Priming* Potential besitzt. Unbedingt festzuhalten bleibt, dass auch NYVAC-B ein *Cross Priming* Potential besitzt, wenn die MDDCs von der Vakzine zusammen mit infizierten Zellbestandteilen stimuliert wird, wie sie in dem Pellet infizierter Fibrozyten enthalten sind.

5 Zusammenfassung

EHV-C ist im Gegensatz zu NYVAC-C in der Lage, dendritische Zellen zu infizieren und zu maturieren. Das konnte in zahlreichen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte das *Cross Priming* Potential der Vakzindekandidaten EHV-C und NYVAC-C auf dendritischen Zellen untersucht werden. Zum einen müssten dendritische Zellen nicht direkt infiziert werden, um eine zelluläre Immunantwort zu generieren. Zum anderen könnte durch *Cross Priming* auch eine Immunantwort gegen solche Viren gewährleistet werden, die die konventionelle MHC-I-Antigen-Prozessierung spezifisch inhibieren. Gerade bei der Verwendung der Vakzine NYVAC-C fällt auf, dass nach Infektion der dendritischen Zellen *in vitro* keine Maturierung erfolgt, jedoch *in vivo* als Teil einer DNA prime/NYVAC boost Vakzinierungsstrategie eine T-Zell Antwort generiert wird.⁴¹

Um das *Cross Priming* Potential der Vakzindekandidaten EHV-C und NYVAC-C zu untersuchen, sollte eine fibrozytenähnliche Zelllinie infiziert werden. Deren Überstände wurden dazu verwendet MDDCs zu maturieren. Diese Maturation wurde mittels FACS-Analyse spezifischer Oberflächenmarker (CD80, CD83, HLA-DR, CD86, CD40, CCR7) und durch die Produktion maturationsspezifischer Zytokine IL-6, IL-10, IL-12 und TNF-alpha gemessen. Außerdem wurden die maturierten MDDCs mit zytotoxischen T-Zellen, die bereits Kontakt mit dem HI-Virus hatten, inkubiert. Die daraus resultierende Interferon- γ Produktion der zytotoxischen T-Zellen wurde mittels Elispot bestimmt.

Zunächst wurden MRC-5 Zellen als zu infizierende Zelllinie verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass auch nicht infizierte MRC-5 Zellen in der Lage sind, MDDCs zu maturieren. Deswegen wurde ein autologes Zellkultursystem entworfen, um eine Aktivierung von MDDCs durch inkompatible Zellen zu vermeiden. Dafür wurde eine Methode entwickelt aus PBMCs fibrozytenähnliche Zellen zu generieren. Die Überstände infizierter autologer Fibrozyten stimulierten MDDCs, die vom gleichen Spender stammten. Einerseits erfolgte so keine Maturation durch nicht infizierte autologe Fibrozyten. Andererseits war festzustellen, dass MDDCs durch den Überstand EHV-C infizierter Fibrozyten gut maturiert werden können. Diese Vorgehensweise resultierte in einer besseren Maturation der MDDCs als durch die direkte Infektion der MDDCs mit EHV-C. Der Überstand NYVAC-C infizierter Fibrozyten bewirkte keine Maturation bei den MDDCs. Tendenziell konnten diese FACS-Ergebnisse auch durch die Produktion eines maturationsspezifischen Zytokinprofils bestätigt

werden. CD8⁺ T-Zellen, die vorher Kontakt mit Epitopen des HI-Virus hatten, wurden durch vorher maturierte MDDCs stimuliert. EHV-B kann nach Infektion von Fibrozyten über die Stimulation von MDDCs bei den zytotoxischen T-Zellen eine Interferon- γ Produktion auslösen. Dies bestätigt das *Cross Priming* Potential von EHV-C. Besonders zu vermerken ist, dass die Stimulation mit dem Pellet NYVAC-infizierter Fibrozyten in einer ähnlich hohen Interferon- γ Produktion resultiert. Während die Stimulation mit Fibrozyten-Überstand, dem Pellet, beides einmal auch durch UV-Strahlung inaktiviert, im Vergleich keine besonderen Unterschiede zeigt, ist die maturationsspezifische Oberflächenmarkerexpression auf MDDCs durch die Stimulation mit infizierten Fibrozyten ohne Auftrennung in Überstand und Pellet am höchsten (verglichen mit der Stimulation nur mit dem Überstand oder nur mit dem Pellet infizierter Fibrozyten). Besonders deutlich ist das Ergebnis bei CD 83, CD 86, CD 40 und CCR7.

Somit konnte gezeigt werden, dass der virale Vektor EHV-C auf MDDCs ein *Cross Priming* Potential besitzt. Aber auch der virale Vektor NYVAC-C kann MDDCs maturieren, wenn er die dendritischen Zellen zusammen mit den infizierten Fibrozyten stimuliert. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass *Cross Priming* eine bessere zelluläre Immunantwort generieren kann. Aber auch NYVAC-C ist in der Lage MDDCs zu maturieren, wenn das Virus nicht direkt, sondern zusammen mit infizierten, teilweise apoptotischen oder nekrotischen Fibrozyten MDDCs stimuliert.

6 Ausblick

Bereits Vorversuche der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass EHV-C ein vielversprechendes Vektorsystem ist. In dieser Arbeit wurde das *Cross Priming* Potential von EHV-C und NYVAC-C auf MDDCs bestätigt.

Die Stimulation von dendritischen Zellen mit dem Überstand EHV-C oder NYVAC-C infizierter Zellen führte zu einer besseren Maturierung der MDDCs als die direkte Infektion. Um die Virusmenge in den Überständen festzustellen, wurden in dieser Arbeit Virustitrationen der Überstände durchgeführt. Dabei gab es Hinweise, dass in den Überständen sowohl EHV-C als auch NYVAC-C enthalten waren, jedoch in wesentlich geringerer MOI als in der ursprünglichen Infektionslösung. Die Virustitrationen waren nur Probeversuche und sind in dieser Arbeit nicht mit aufgenommen. Eine saubere Virustitration der stimulierenden Überstände sollte in zukünftigen Arbeiten durchgeführt werden.

Im Rahmen des vorliegenden Projekts konnte das *Cross Priming* der HIV+ CD8⁺ T-Zellen im autologen System *in vitro* etabliert werden. Wenn MDDCs mit dem Pellet NYVAC-C infizierter Fibrozyten maturiert wurden, konnten diese die HIV+CD8⁺ T-Zellen zu einer Interferon- γ Produktion anregen. FACS-analytisch konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenmarker CD40 und CCR7 durch NYVAC-infizierte Fibrozyten ohne Auftrennung in Überstand und Pellet deutlich hochreguliert wurden. In zukünftigen Versuchen sollte das *Cross Priming* Potential auf T-Zellen nicht nur mit dem Überstand oder dem Pellet NYVAC-C und EHV-C infizierter Zellen untersucht werden, sondern auch mit infizierten autologen Fibrozyten ohne Auftrennung. Dabei ist die Hypothese, dass CD8⁺ T-Zellen durch die MDDCs, die mit infizierten Fibrozyten ohne Auftrennung maturiert wurden, noch besser aktiviert werden können.

In der theoretischen Analyse der Ergebnisse wurde auf die Bedeutung von Apoptose und Nekrose der primär infizierten Zellen in Bezug auf die Aktivierung dendritischer Zellen hingewiesen. Für ein besseres Verständnis der immunologischen Zusammenhänge bei der Verwendung von viralen Vektoren wie EHV-C und NYVAC-C sollte der Einfluß von apoptotischen und nekrotischen Zellen auf dendritische Zellen näher untersucht werden.

7 Anhang

Medien

DMEM (Dullbecco's Modified Eagle Medium)	4500 mg/L Glucose L-Glutamin Pyruvat	Gibco®
DC-Medium	500 ml RPMI 1640 50 ml FKS oder autologes (AB-) Serum 5. ml Vitamine (MEM (100x) vitamine solution) 6. ml L-Glutamin (200mM) 7. ml MEM (non-essential Amino Acids) 8. ml Pyruvat (MEM Sodium Pyruvat, 100 mM) 0,5 ml β -Mercaptoethanol (5×10^{-5} M) 2 ml Pen/Strep (40 IU/ml Penicillin; 40 μ g/ml Streptomycin)	PAN™ Biotech PAN™ Biotech PAN™ Biotech Biochrom® Gibco® Gibco® Gibco® Gibco®
RPMI 1640	mit L-Glutamin mit 2,0 g/L NaHCO ₃	PAN™ Biotech
Fibrozyten-Medium	DMEM + 20% FKS	
R10-Medium	RPMI 1640 10% FKS 1% PSN (Penicillin, Streptomycin, Neomycin)	PAN™ Biotech Gibco®
R20-Medium	RPMI 1640 20% FKS 1% PSN (Penicillin, Streptomycin, Neomycin)	
Ultra Culture Medium		Cambrex®

Puffer, Reagentien, Lösungen, Chemikalien

PBS	5. mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl	
MACS [®] -Puffer	PBS 0,5% FKS 2mM EDTA	
Perm/Wash	0,1% Saponin in PBS	
Cytofix/Cytoperm	4% Paraformaldehyd (PFA) 1% Saponin	
Coating Puffer (ELISA)	0,1 M Sodium Carbonat 8,4 g NaHCO ₃ 3,56 g Na ₂ CO ₃ in 1,0 L (pH 9,5)	BD Biosciences [™]
Wash Puffer (ELISA)	PBS 10% Tween [®] 20	BD Biosciences [™] Sigma-Aldrich [®]
Substrat Solution (ELISA)	Tetramethylbenzidin (TMB) und Wassertoffperoxid TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences [™]
Assay Diluent (ELISA)	PBS 10% FKS	
Stop Solution (ELISA)	0,5 M H ₂ SO ₄	
Capture Antibody (ELISA)	OptEIA [™] Set Human IL-6, IL-10, IL-12, TNF Anti-human	BD Biosciences [™]
Detection Antibody (ELISA)	OptEIA [™] Set Human IL-6, IL-10, IL-12, TNF Biotinylierter anti-human	BD Biosciences [™]
Enzym Reagenz	Avidin-horseradish peroxidase conjugate	BD Biosciences [™]
Coating Solution (ELISPOT)	Anti-Human Interferon-γ mAB 1-D1K 1:100 Verdünnung mit PBS	MABTECH [®]
Desinfektionslösung (ELISPOT)	4% Bleach	

Waschlösung (ELISPOT)	PBS 0,05% Tween [®] 20	Sigma-Aldrich [®]
Assay Diluent (ELISPOT)	PBS 0,5% BSA (bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich [®]
BCIP/NBT Substratlösung		Pierce [®]
Biotinyliertes mouse anti-human IFN- γ -Reagenz-	Biotinylated mouse anti human IFN- γ mAB 1:1000 in PBS 0,5% FKS	Vector Laboratories [®]
Mit alkalischer Phosphatase konjugierter anti- biotin Antikörper -Reagenz-	Anti-biotin Antikörper 1:750 in Assay Diluent (ELISPOT)	Vector Laboratories [®]
TWEEN [®] 20	Polysorbat 20	Sigma-Aldrich [®]
FACS-Puffer	PBS 1% FKS 0,1% Na ₃ N	
P2	PBS 2% FKS	
Fc-Rezeptorblocker		MACS [®]
FKS (fötales Kälberserum)		PAN TM Biotech
AB-Serum (human)		PAA Laboratories GmbH
Trypanblaulösung		Merk [®]
CD14 Micro Beads	MACS [®]	Miltenyi Biotec [®]
DMSO	Dimethylsulfoxid	

Zytokine

Interleukin 4	Strathmann [®]
Interleukin 6	BD Biosciences [™]
Interleukin 10	BD Biosciences [™]
Interleukin 12	BD Biosciences [™]
GM-CSF (granulocyte macrophage stimulating factor)	Strathmann [®]
TNF- α	BD Biosciences [™]

Antikörper

CD80-FITC	BD Biosciences [™]
CD83-PE	BD Biosciences [™]
CD86-PE-Cy5	BD Biosciences [™]
HLA-DR-ECD	Beckman Coulter [®]
CD40-FITC	BD Biosciences [™]
CCR7-PE	R&D Systems [®]
P24-Antikörper-PE	Beckman Coulter [®]
Anti-Collagen Type I mAB (mouse)	Chemicon [®]
Anti-mouse AB-FITC	Chemicon [®]

Sonstige Materialien

FACS-Röhrchen		Sarstedt [®]
FACS-Gerät	Coulter [®] Epics [®] XL-MCL [™]	Beckman Coulter [®]
Transwells	Porendurchmesser 0,4µm	Milian [®]
Mikrotiterplatte (ELISA)	MaxiSorb [®]	Nunc [®]
Mikrotiterplatte (ELISPOT)	MAIP S45	Millipore [®]
Fibronectin coated Zellkulturflaschen	FALCON [®] 25 cm ²	BD Biosciences [™]

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABS	AB-Serum
Ad5	Adenovirus type 5
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
ALVAC	recombinant canarypox virus
APC	antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)
BAC	bacterial artificial chromosome
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bzw.	beziehungsweise
CCR7	Chemokinrezeptor 7 (chemokine receptor) (CD197)
CD	cluster of differentiation
DANN	deoxyribonucleic acid
DC	dendritic cell
DMEM	Dullbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	double stranded ribonucleic acid
ECD	PE-Texas Red
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHV(-B/C)	Equines Herpesvirus (-B-Clade/C-Clade)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Env	envelope (HIV-Gen)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate
FKS	fötales Kälberserum

g	Beschleunigung: $1g = 9,81 \text{ m/s}^2$
Gag	Gruppenspezifisches Antigen (HIV-Gen)
gfp	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	granulocyte macrophage stimulating factor
Gp	Glykoprotein
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus (human immunodeficiency virus)
HLA	human leukocyte antigen
HVTN505	HIV vaccine trials network 505 (clinical trial)
iDCs	Immature dendritische Zellen (immature dendritic cells)
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MDDCs	monocyte derived dendritic cells
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
mini-F-Plasmid	prokaryontisches Fertilitätsplasmid
ml	Milliliter
MOI	multiple of infection
MRC-5	Medical Research Council-5
MVA	modified vaccinia ancara
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Nef	negative regulatory factor (HIV-Gen)
NF- κ B	nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NYVAC	New York Vakzinia Virus
p24	Protein 24
PAMPs	pathogen associated molecular pattern
PBMCs	periphere blood mononuclear cells
PBS	periphere buffered saline
PE	Phycoerythrin

PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin5 (Kombinationsfluoreszenzfarbstoff)
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
Pol	HIV-Gen: kodiert für virale Enzyme (u.a. reverse Transkriptase)
PRRs	pattern recognition receptors
PSN	Penicillin Streptomycin Neomycin
RPMI	roswell park memorial institute (Medium)
RV144	„Thai Phase III HIV vaccine clinical trial“
SIV	simian immunodeficiency virus
Strep	Streptomycin
TAP	transporters associated with antigen processing
TCR	T-Zellrezeptor (T-cell receptor)
TH-Zelle	T-Helferzelle
TLR	toll like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VLP	virus like particles
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

1. Gordon Ada AR. Vaccines, Vaccination and the Immune Response. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.
2. Plotkin Stanley A. MEA. Vaccines. Philadelphia: W.B. Saunders; 1994.
3. Plotkin SA. Vaccines, vaccination, and vaccinology. J Infect Dis 2003;187:1349-59.
4. Antonio Alcamí ID, David Evans, John W Huggins, Christine Hughes, Peter B Jahrling, Grant McFadden, Hermann Meyer, Bernard Moss, Sergei Shchelkunov, Evgeny Stavskiy, Nina Tikunova. Scientific review of variola virus research, 1999-2010. WHO December 2010:Page 6.
5. WHO. Poliomyelitis. Factsheet N°114 November 2010.
6. Wild J, Wagner R. Current status and strategies of HIV-vaccine development. Internist 2003;44:711-+.
7. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. Science 1999;283:857-60.
8. McMichael AJ. HIV vaccines. Annu Rev Immunol 2006;24:227-55.
9. Johnston MI, Fauci AS. An HIV vaccine--evolving concepts. N Engl J Med 2007;356:2073-81.
10. Girard MP, Osmanov S, Assossou OM, Kieny MP. Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review. Vaccine 2011.
11. Letvin NL. Progress toward an HIV vaccine. Annu Rev Med 2005;56:213-23.
12. Pantaleo G, Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. Nat Med 2004;10:806-10.
13. Janeway T, Walport, Shlomchik. Immunobiology - The immune system in health and disease. 6th edition 2005:page 26-34.
14. Herausgeber: Dennis L Kasper EB, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Manfred Dietel, Norbert Suttrop, Martin Zeitz; Autoren: Barton F. Haynes, Anthony S. Fauci, Jan L. Hülsemann, Markus Rühl. Harrisons Innere Medizin (deutsche Ausgabe), 16. Auflage, Kapitel 295 Einführung in das Immunsystem. 2005:pages 2061-4.
15. Janeway T, Walport, Shlomchik. Immunobiology - the immune system in health and disease. 6th edition 2005:chapter 2-9; page 53-4.
16. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998;392:245-52.

17. Jeras M, Bergant M, Repnik U. In vitro preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses. *Transpl Immunol* 2005;14:231-44.
18. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
19. Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005;175:1373-81.
20. Janeway T, Walport, Shlomchik. The immune system in disease and health. 6th edition 2005:chapter 3-12, 3-3; pages 118-21.
21. Castiello L, Sabatino M, Jin P, et al. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60:457-66.
22. Janeway T, Walport, Shlomchik. The immune system in health and disease. 6th edition 2005:Chapter 8.
23. Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2010;22:109-17.
24. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:47-64.
25. Janeway T, Walport, Shlomchik. The immune system in health and disease. 6th edition 2005:pages 170-82.
26. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 2003;425:402-6.
27. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003;425:397-402.
28. Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 2006;25:607-17.
29. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004;199:9-26.
30. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 2001;1:126-34.
31. Hofmann-Sieber H. Etablierung des Equinen Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) als neues virales Vektorsystem. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und vorklinische Medizin- der Universität Regensburg 2008;Gliederungspunkt A.2 "BAC (Bacterial Artificial Chromosome) Technologie" und C.1.1 "Herstellung rekombinanter Viren".
32. Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, et al. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 1992;188:217-32.

33. Böckl. Equine Herpesvirale Vektoren als neue HIV Vakzinekandidaten: Untersuchungen zur Aktivierung und Maturierung humaner Dendritischer Zellen ex vivo. Diplomarbeit an der Fachhochschule Weihenstephan, durchgeführt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg 2006:Material und Methoden.
34. Rothe G. Zelluläre Diagnostik, Hrsg. U. Sack, A. Tarnok, G. Rothe. Kapitel: Technische und methodische Grundlagen der Durchflussszytometrie 2006.
35. Harrer T, Harrer E, Barbosa P, et al. Recognition of two overlapping CTL epitopes in HIV-1 p17 by CTL from a long-term nonprogressing HIV-1-infected individual. *J Immunol* 1998;161:4875-81.
36. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 1970;227:168-70.
37. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998;392:86-9.
38. Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* 2001;166:3717-23.
39. Kis Z, Pallinger E, Endresz V, et al. A soluble factor(s) released by MRC-5 cells early and late after human cytomegalovirus infection induces maturation of monocyte-derived dendritic cells. *Arch Virol* 2006;151:2277-87.
40. Guerra S, Najera JL, Gonzalez JM, et al. Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J Virol* 2007;81:8707-21.
41. Harari A, Bart PA, Stohr W, et al. An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J Exp Med* 2008;205:63-77.
42. Engelmayer J, Larsson M, Subklewe M, et al. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* 1999;163:6762-8.
43. Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6307-12.
44. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001;166:7556-62.
45. Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol* 1998;160:419-25.
46. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54 Pt 1:1-13.
47. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.

48. Williams BR. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 1999;18:6112-20.
49. Reis e Sousa C. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* 2001;14:495-8.
50. Kis Z, Pallinger E, Endresz V, et al. The interactions between human dendritic cells and microbes; possible clinical applications of dendritic cells. *Inflamm Res* 2004;53:413-23.
51. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000;12:1539-46.
52. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002;2:965-75.
53. Humlova Z, Vokurka M, Esteban M, Melkova Z. Vaccinia virus induces apoptosis of infected macrophages. *J Gen Virol* 2002;83:2821-32.
54. Bellone M, Iezzi G, Rovere P, et al. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J Immunol* 1997;159:5391-9.
55. Walter I, Nowotny N. Equine herpes virus type 1 (EHV-1) infection induces alterations in the cytoskeleton of vero cells but not apoptosis. *Arch Virol* 1999;144:1827-36.
56. Hijnen WA, Beerendonk EF, Medema GJ. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res* 2006;40:3-22.

10 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner für die Überlassung des Themas, für die Betreuung und die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg.

Ich bedanke mich bei der Arbeitsgruppe Wagner für die gute Zusammenarbeit, besonders bei Dr. Katharina Böckl, Dr. Helga Hofmann-Sieber und Dr. Jens Wild, die mir stets mit gutem Rat zur Seite standen.

Vielen Dank an meine Mutter Claudia Vogel für das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei meinen Eltern und Geschwistern möchte ich mich für die Unterstützung und ihr Verständnis in jeglicher Hinsicht besonders bedanken.

Vielen lieben Dank an meine Julia, die mich von Beginn an in allen Höhen und Tiefen begleitet hat.

Dr. Dipl.-ing. Josef Köstler hat mich von Anfang an bei der laborexperimentellen Arbeit angeleitet und mich auch in allen wissenschaftlichen Fragestellungen geduldig betreut. Dafür möchte ich ihm ganz besonders danken.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zum *Cross Priming* Potential der HIV Vakzinekandidaten EHV-C/B und NYVAC-C/B auf über Monozyten generierten dendritischen Zellen“ ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, 13.01.2013

Matthias Vogel